

Université de Sherbrooke

**Implication fonctionnelle de la localisation du récepteur du PAF dans
les radeaux lipidiques**

Par
Caroline Poisson
Service d'Immunologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en Immunologie

11 Septembre 2005



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-17348-0

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-17348-0

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Table des matières

Table des matières	iii
Illustrations et tableaux	v
Liste d'abréviations	vi
Résumé	
Introduction	9
Partie 1. Facteur d'activation des plaquettes (PAF)	9
1.1 Biosynthèse du PAF	9
1.2 Mécanismes de régulation du PAF	12
1.3 Cellules productrices et cellules cibles du PAF	13
1.4 Rôles pathophysiologiques du PAF	14
Partie 2. Récepteur du facteur d'activation des plaquettes (PAFR)	16
2.1 Clonage et caractérisation du PAFR	16
2.2 Signalisation du PAFR	19
2.3 Désensibilisation et internalisation du PAFR	21
2.4 Antagonistes du PAFR	21
Partie 3. Radeaux lipidiques et caveolae	23
3.1 Définition des radeaux lipidiques	23
3.2 Définition des caveolae	24
3.2.1 Membres de la famille des cavéolines	26
3.2.2 Clonage de la cavéoline-1	26
3.2.3 Caractérisation des différents domaines de la cavéoline-1	27
3.3 Rôles des caveolae et des radeaux lipidiques	30
Objectifs et stratégies	32

<i>Avant-propos de l'article</i>	34
<i>Discussion</i>	57
Microdomaines lipidiques et PAFR	57
Éléments de signalisation intracellulaire	62
<i>Conclusion</i>	67
<i>Remerciements</i>	70
<i>Bibliographie</i>	71

Illustrations et tableaux

Figure 1. Structure du PAF

(Honda *et al.* 2002)

Figure 2. Biosynthèse et dégradation du PAF

(Honda *et al.* 2002)

Figure 3. Représentation schématique du PAFR

(Prescott *et al.* 2000)

Figure 4. Signalisation du PAFR

(Izumi *et al.* 1995)

Figure 5. Radeau lipidique et caveola

(Quest *et al.* 2004)

Tableau 1. Effets physiologiques et pathophysiologiques du PAF

(Izumi *et al.* 1995)

Tableau 2. Effets de différents antagonistes du PAFR

(Peplow, 1999)

Tableau 3. Protéines possédant un domaine de liaison à la cavéoline-1

(Couet *et al.* 1997)

Liste d'abréviations

BRET : Bioluminescence Resonance Energy Transfer

CD : Méthyl- β -cyclodextrine

EGF : Epidermal growth factor

EGFR : Récepteur de l'EGF

ERK : Extracellular signal-regulated kinase

GPCR : G protein-coupled receptor

GRK : G-protein receptor kinases

GTPase : Guanine nucleotide-binding proteins

HA : hémagglutinine

IFN- γ : Interféron-gamma

IP3 : Inositol 1,4,5-triphosphate

LPS : Lipopolysaccharide

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

PAF : Platelet-activating factor

PAF-AH : PAF acéthylhydrolase

PAFR : Récepteur du PAF

PI3K : Phosphatidylinositol 3 kinase

PKC : Protéine kinase C

PLC : Phospholipase C

Résumé

Implication fonctionnelle de la localisation du récepteur du PAF dans les radeaux lipidiques

Le PAF (facteur d'activation des plaquettes) est un médiateur lipidique d'inflammation très puissant impliqué dans plusieurs conditions pathophysiologiques. Il agit principalement via un seul récepteur, de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) appelé PAFR. Les caveolae et les radeaux lipidiques représentent deux classes distinctes de microdomaines lipidiques de la membrane plasmique importants pour la signalisation intracellulaire. Pour sa part, la cavéoline-1 est la protéine de structure principale des caveolae et interagit physiquement avec plusieurs protéines. Un site potentiel de liaison à la cavéoline-1 a été retrouvé dans la séquence du PAFR et plusieurs molécules de signalisation activées par le PAFR sont enrichies dans les caveolae. Le but de cette étude était donc de déterminer si le PAFR pouvait être associé avec les caveolae ou les radeaux lipidiques et, le cas échéant, de démontrer l'implication d'une telle association sur la signalisation du PAFR. Nous avons démontré que le PAFR est localisé dans les caveolae, en plus d'être physiquement associé à la cavéoline-1 lorsque cette protéine est présente. Cependant, en absence de cavéoline-1, le PAFR est tout de même retrouvé en association avec les radeaux lipidiques. L'altération des caveolae et des radeaux lipidiques par la méthyl- β -cyclodextrine contribue à réduire significativement la production d'inositol phosphates ainsi la mobilisation calcique induites par le PAF, suggérant que le couplage du PAFR avec $G\alpha_q/11$ dépend de l'intégrité de ces microdomaines. Cependant, alors qu'un traitement à la cyclodextrine diminue l'activation

de ERK1/2 chez les cellules exprimant la cavéoline-1, l'effet opposé est observé chez les cellules n'exprimant pas de caveolae à leur surface. De plus, l'activation du promoteur de l'interleukine-8 est, lui aussi, dépendant, en partie, de l'intégrité des microdomaines lipidiques. En conclusion, le PAFR est localisé à la fois dans les caveolae et dans les radeaux lipidiques et cette localisation est importante pour la signalisation du PAFR.

Introduction

Partie 1. Facteur d'activation des plaquettes (PAF)

1.1 Biosynthèse du PAF

Le facteur d'activation des plaquettes (PAF), aussi connu sous le nom de 1-*O*-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (Figure 1), fut le premier phospholipide bioactif à être caractérisé structuralement (Benveniste, Tence et al. 1979; Blank, Snyder et al. 1979; Demopoulos, Pinckard et al. 1979). Ce médiateur lipidique d'inflammation est si puissant qu'il induit généralement des réponses biologiques significatives à de très faibles concentrations (Peplow 1999).

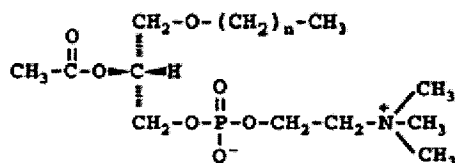


Figure 1. Structure du PAF (Honda *et al.* 2002)

Il existe deux voies de synthèse du PAF, la voie de remodelage, utilisée lors stimulation cellulaire spécifique et la voie de synthèse *de novo*, qui ne requiert pas de stimulation cellulaire (Figure 2) (Prescott, Zimmerman et al. 1990; Izumi and Shimizu 1995; Snyder 1995; Prescott, Zimmerman et al. 2000). Il n'existe pas de réserve de PAF. Il serait plutôt rapidement synthétisé par la voie de remodelage en situation inflammatoire. La phospholipase A₂ cytoplasmique (cPLA₂) est l'enzyme responsable de l'initiation de la première phase de la voie de remodelage (Prescott, Zimmerman et al. 2000), catalysant la formation de lyso-PAF à partir d'un phosphoglycéride contenant un

groupement choline ou inositol (Peplow 1999). Cette réaction aura pour effet de relâcher de l'acide arachidonique libre, qui pourra alors être converti en prostaglandines, leukotriènes et thromboxanes, qui vont agir de concert avec le PAF pour amplifier la réaction inflammatoire. Le lyso-PAF formé est ensuite converti en PAF par l'ajout d'un résidu acétyl, réaction catalysée par une acétyltransférase spécifique (acétyl-CoA-lyso-PAF acétyltransférase). Il existe aussi une autre voie de formation du PAF, impliquant la synthèse de 1-*O*-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycérol, ensuite converti en PAF par une choline phosphotransférase unique. La raison physiologique de cette formation *de novo* de PAF est cependant moins bien caractérisée et comprise que la formation de PAF induite par une stimulation cellulaire. Le PAF est un facteur soluble retrouvé dans le sang, donc sécrété par les cellules productrices, mais la façon dont il est transporté à l'extérieur de la cellule reste indéfini. Il existerait aussi une forme de PAF non sécrétée, en particulier chez les cellules endothéliales (McIntyre, Zimmerman et al. 1985; McIntyre, Zimmerman et al. 1986) et chez les leucocytes, plus particulièrement chez le neutrophile (Lynch and Henson 1986; Sisson, Prescott et al. 1987).

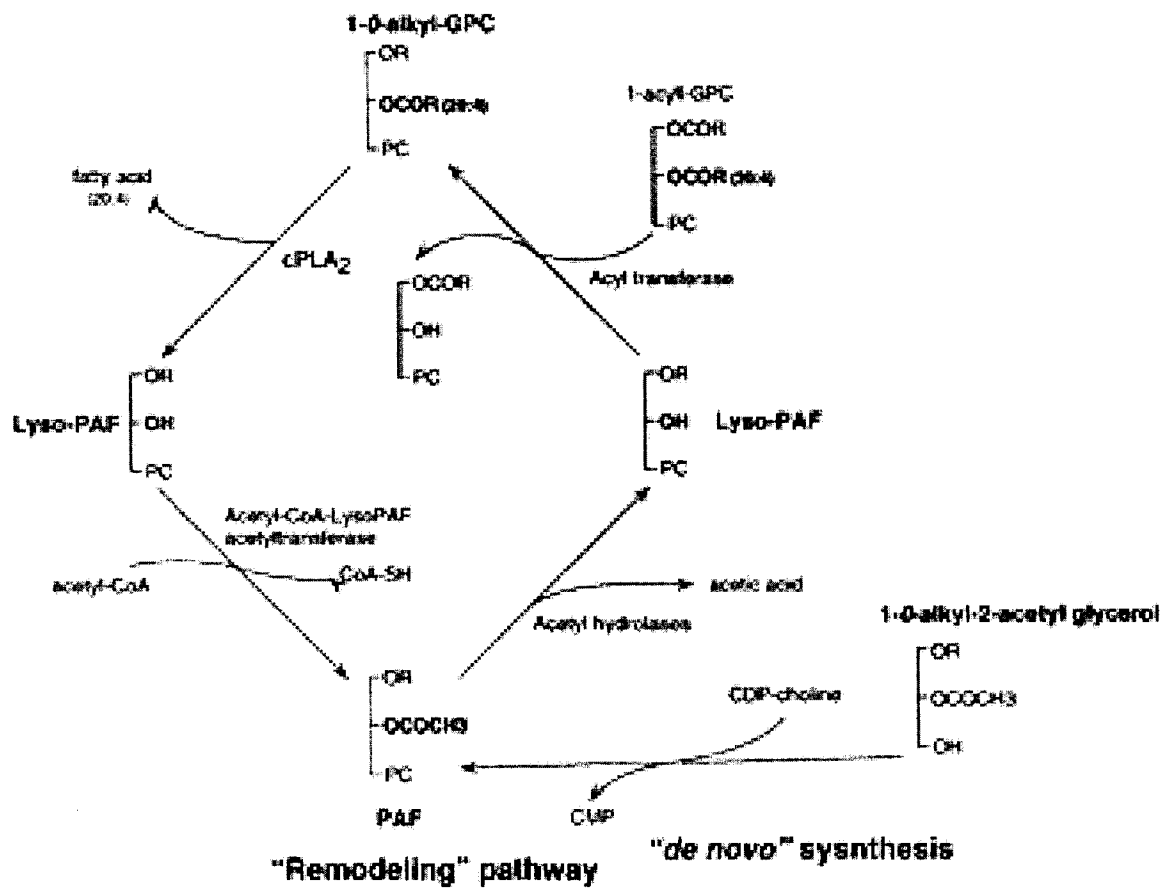


Figure 2. Biosynthèse et dégradation du PAF (Honda *et al.* 2002)

1.2 Mécanismes de régulation du PAF

Le PAF étant un médiateur lipidique d'inflammation puissant, il se doit d'être sous le contrôle de mécanismes de régulation très stricts. Ces mécanismes incluent des voies de synthèse du PAF très bien contrôlées, des enzymes de dégradation efficaces présentes et actives de façon constitutive, ainsi qu'une régulation de l'expression et de l'activité du récepteur du PAF (PAFR) (Peplow 1999). La dégradation du PAF (Figure 2) en produit inactif (lyso-PAF) est catalysée par une famille d'enzymes appelées PAF acétylhydrolases [1-alkyl-2-acétyl-glycérophosphocholine estérase] (PAF-AH) (Prescott, Zimmerman et al. 1990; Prescott, Zimmerman et al. 2000). Ces enzymes de la famille des PLA₂ (Dennis 1997) existeraient sous deux formes, soient une forme tissulaire et une forme plasmatique. Il existe trois isoformes de PAF-AH intracellulaire, soient les formes Ia, Ib et II, toutes retrouvées dans le cerveau humain (Hattori, Aoki et al. 1996; Ho, Swenson et al. 1997), mais ayant aussi une distribution assez ubiquiste. Les macrophages activés (Elstad, Stafforini et al. 1989; Stafforini, Elstad et al. 1990) et les cellules hépatiques (Tarbet, Stafforini et al. 1991) produisent et secrètent du PAF-AH, qui constituerait la source de d'acétylhydrolase plasmatique. Il n'existe qu'une forme de PAF-AH plasmatique et elle circulerait dans le sang en association avec des « low density lipoproteins » (LDLs) et des « high density lipoproteins » (HDLs) (Stafforini, McIntyre et al. 1987). L'activité de cette enzyme serait sous contrôle hormonal (Pritchard 1987; Miyaura, Maki et al. 1991) sous régulation transcriptionnelle par des médiateurs inflammatoires tels l'interféron-gamma (IFN- γ) et le lipopolysaccharide (LPS) (Cao, Stafforini et al. 1998).

1.3 Cellules productrices et cellules cibles du PAF

Si les cellules de type monocytes et macrophages produisent du PAF lorsqu'elles sont activées (Elstad, Stafforini et al. 1989), le PAF est aussi produit par les basophiles (Benveniste, Henson et al. 1972), les cellules endothéliales et les neutrophiles (Prescott, Zimmerman et al. 2000). La liaison du PAF à des sites spécifiques a été confirmée par expériences de liaison de PAF ou d'antagoniste de PAF sur son récepteur. Ces études ont montré que le PAF pouvait se lier spécifiquement sur les plaquettes, les neutrophiles, les éosinophiles, les cellules B (Travers, Li et al. 1989; Kuruvilla, Putcha et al. 1991; Nguer, Pellegrini et al. 1992) les macrophages, dont la microglie et les cellules de Kupffer (macrophages résidants du foie), les monocytes, les cellules du muscle lisse, les cellules endothéliales vasculaires, les cellules épidermales (Pei, Barber et al. 1998; Shimada, Ota et al. 1998), etc (Ishii and Shimizu 2000). On a mis en évidence l'ARNm du PAFR dans la rate, les reins, le foie, le cœur, les muscles squelettiques et le cerveau de plusieurs espèces (Ishii and Shimizu 2000). Par technique d'hybridation *in situ*, on a aussi retrouvé l'ARNm du PAFR dans les cellules mésangiales de reins de rats, les vaisseaux sanguins, les muscles lisses et les parois alvéolaires des poumons humains ainsi que dans la microglie et les neurones de cerveaux de rats (Honda, Ishii et al. 2002). Le PAF pourrait aussi se lier à certains tissus comme les poumons, le foie, le cerveau, la rétine, l'iris, l'utérus, etc. Le PAF aurait donc des actions sur plusieurs types cellulaires et sur plusieurs tissus, ce qui en fait un médiateur lipidique d'inflammation très important.

1.4 Rôles pathophysiologiques du PAF

Plusieurs études ont permis de démontrer les effets pathophysiologiques du PAF (Tableau 1), en se basant sur la production de PAF, l'expression du récepteur du PAF, les réponses au PAF, les effets d'antagonistes de PAF ou de PAF-AH, ou encore par reproduction de conditions pathologiques en utilisant le PAF. Plus récemment, l'établissement de souris transgéniques et de souris « knock out » (KO) a permis de mieux comprendre et de confirmer les divers rôles du PAF. Ces études démontrent que ce médiateur inflammatoire serait impliqué dans les mécanismes moléculaires de l'anaphylaxie, de l'asthme bronchique, du choc endotoxinique, des infections à streptocoques, des maladies de la peau et des désordres du système nerveux central (Ishii, Nagase et al. 2002). De plus, il jouerait un rôle dans la reproduction et l'athérosclérose (Ishii and Shimizu 2000; Honda, Ishii et al. 2002).

Table 1
Physiological and pathophysiological effects of PAF

Blood cells	<ul style="list-style-type: none"> Platelet aggregation and secretion Chemotaxis and activation of neutrophils Chemotaxis and activation of eosinophils Activation of macrophages and monocytes Stimulation of B lymphocytes
Whole body	<ul style="list-style-type: none"> <i>Acute inflammations</i> <i>Allergic disorders</i> <i>Endotoxin shock</i> <i>Anaphylactic shock</i> <i>Disseminated intravascular coagulation</i>
Central nervous system	<ul style="list-style-type: none"> Synaptic plasticity <i>Ischemic brain damage</i> <i>Convulsion</i>
Cardiovascular system	<ul style="list-style-type: none"> Hypotension Bradycardia Negative inotropic effect (cardiac muscle) <i>Myocardial ischemia</i>
Respiratory system	<ul style="list-style-type: none"> Bronchoconstriction Bronchial hyperreactivity <i>Bronchial asthma</i> <i>Acute lung injury</i>
Gastrointestinal system	<ul style="list-style-type: none"> Smooth muscle contraction of gastrointestinal tract Portal vein hypertension Glycogenolysis in the liver <i>Peptic ulcer</i>
Kidney	<ul style="list-style-type: none"> Proliferation of mesangial cells Inhibition of renin release <i>Glomerulonephritis</i>
Reproductive system	<ul style="list-style-type: none"> Ovulation Ovoimplantation Stimulation of embryo

Diseases are given in italics.

Tableau 1. Effets physiologiques et pathophysiologiques du PAF (Izumi *et al.* 1995)

Partie 2. Récepteur du facteur d'activation des plaquettes (PAFR)

2.1 Clonage et caractérisation du PAFR

Le récepteur du PAF a été cloné chez plusieurs espèces, dont la souris (Ishii, Matsuda et al. 1996), le porc (Honda, Nakamura et al. 1991) et l'humain (Nakamura, Honda et al. 1991) dans les années 1990. Ces études s'accordent pour dire que le récepteur du PAF fait partie de la grande famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires, et donc, liés aux protéines G (Figure 4). Le gène codant pour le PAFR est situé sur le chromosome Ip35-p34.4 et ce gène serait présent de façon constitutive, quoiqu'il puisse être régulé au niveau de la transcription par divers agents inflammatoires incluant le PAF lui-même (Mutoh, Ishii et al. 1994; Thivierge, Parent et al. 1996; Dagenais, Thivierge et al. 1997; Wang, Tan et al. 1997). Jusqu'à ce jour, aucun autre sous-type de récepteur n'a été découvert pour lier le PAF.

Le PAFR humain (Izumi and Shimizu 1995) possède 342 acides aminés et le poids moléculaire calculé est de 39 000. Il y aurait 1 à 2 sites potentiels de *N*-glycosylation selon l'espèce et un site potentiel de palmitoylation au niveau de la Cys316 ou Cys317, en C-terminal. Il y aurait aussi un ensemble de 9 résidus Ser/Thr vers la queue C-terminale du récepteur et quelques uns de ces résidus seraient impliqués dans la liaison des GRKs (G-protein receptor kinases). Une autre étude mentionne que des sites de phosphorylation dans la queue C-terminale seraient importants pour le désensibilisation du récepteur induite par l'agoniste (Takano, Honda et al. 1994). De plus, une récente analyse de la séquence du PAFR révèle un motif potentiel de liaison à la cavéoline-1, protéine intégrale de la membrane plasmique et composante principale des

caveolae, sous-population de radeaux lipidiques. Cette séquence couvre les acides aminés Tyr293 à Phe300 inclusivement.

Au laboratoire des Drs Pleszczynski et Stankova, le récepteur du PAF humain est une gracieuseté du Dr. Richard Ye, de « The Scripps Research Institute », situé à La Jolla, Californie (Parent, Le Gouill et al. 1996). Christian Le Gouill et Jean-Luc Parent (Le Gouill, Parent et al. 1997) l'ont modifié en lui insérant une étiquette c-Myc en N-terminal pour leur permettre de mieux l'étudier. De plus, Christian Le Gouill a sous-cloné le récepteur du PAF dans des vecteurs de BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer), une technique utile pour déterminer la proximité de deux protéines dans des cellules vivantes. Ces constructions n'ont pas encore été utilisées à des fins de publication, mais apparaissent dans l'article soumis pour publication retrouvé dans ce mémoire.

La production de différents mutants du récepteur du PAF, et ce, par plusieurs équipes différentes, a permis de comprendre, entre autres, son couplage aux protéines G, sa liaison au ligand, sa signalisation et ses états d'activation. Ces différentes mutations ont été superbement réunies dans 2 revues sur le PAF et son récepteur (Prescott, Zimmerman et al. 2000; Honda, Ishii et al. 2002). En résumé, les résidus histidines 188, 248 et 249 formeraient une pochette pour la liaison du PAF, la cystéine 95 serait importante pour une fonction optimale du récepteur et les résidus phénylalanines 97 et 98 seraient probablement impliqués dans la conformation du récepteur. La mutation N100A confère pour sa part au PAFR un phénotype constitutivement actif, tout comme la mutation L231R. À l'inverse, les mutations D289A et A230E/Q rendent le PAFR inactif sans toutefois affecter sa liaison au PAF.

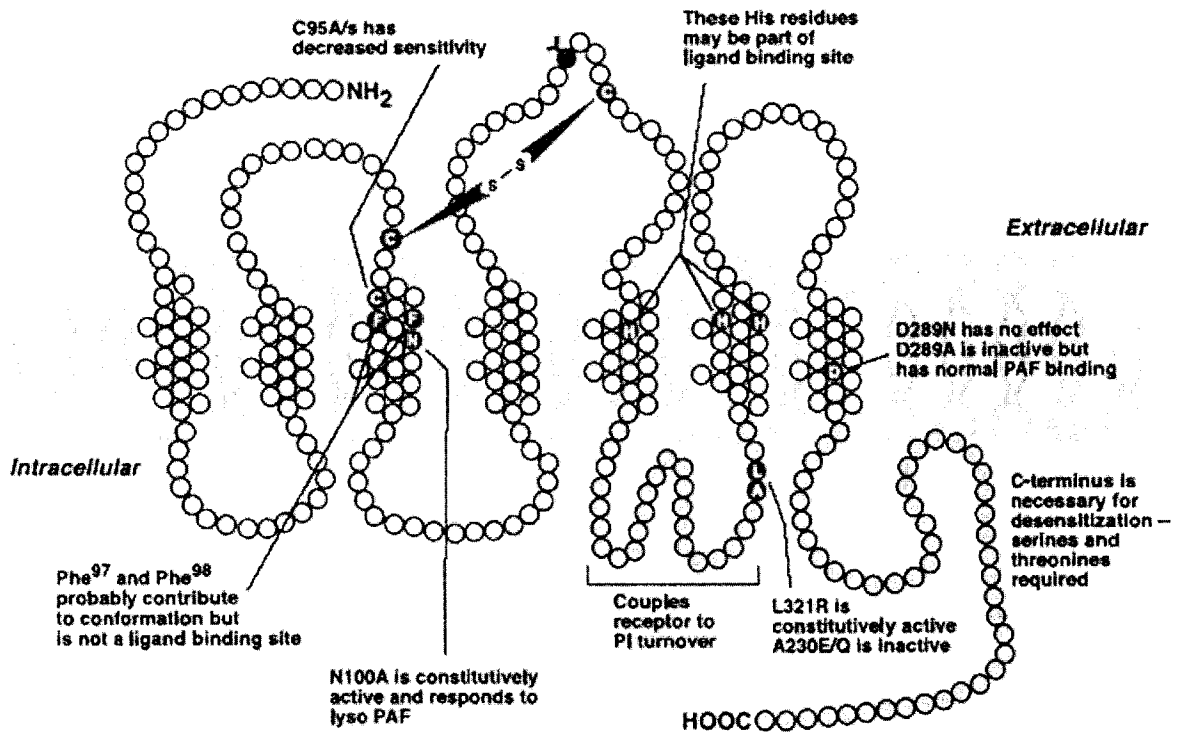


Figure 3. Représentation schématique du PAFR

(Prescott *et al.* 2000)

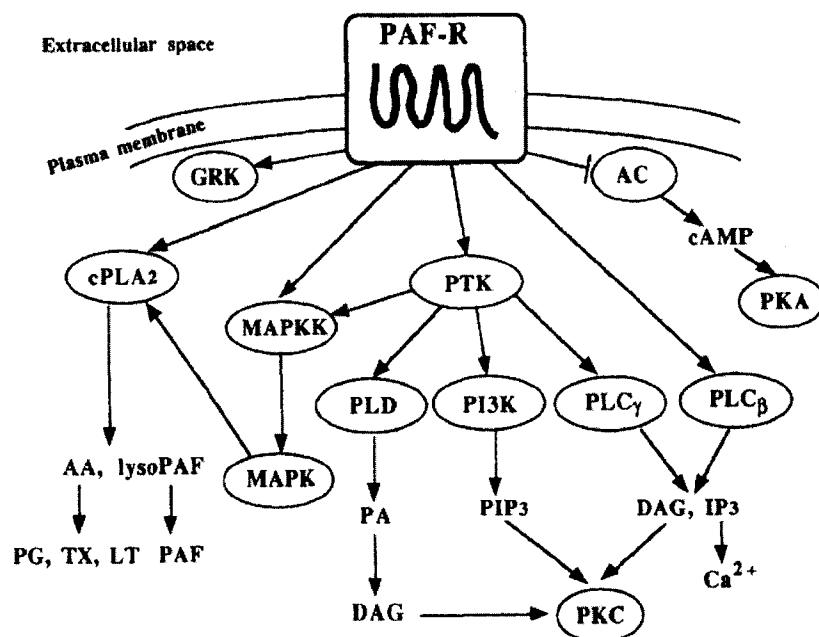


Figure 4. Signalisation du PAFR (Izumi *et al.* 1995)

2.2 Signalisation du PAFR

En tant que membre de la superfamille de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), le PAFR est en mesure d'activer différents sous-types de ces protéines trimériques. En effet, il a été démontré que le PAFR est en mesure de lier et d'activer les sous-unités $G_{\alpha q/11}$, $G_{\alpha o}$ et $G_{\alpha i}$ des protéines G (Ali, Richardson et al. 1994; Honda, Takano et al. 1994; van Biesen, Hawes et al. 1996; Nick, Avdi et al. 1997; Dupre, Le Gouill et al. 2001). De façon générale, l'activation des protéines G mène à des fonctions cellulaires largement dépendantes du contexte cellulaire, variant de la polarisation cellulaire, à l'adhésion cellulaire, la motilité cellulaire et l'expression génique (Marinissen and Gutkind 2001).

Le PAF stimule aussi le « turnover » des phospholipides membranaires via l'activation de phospholipases C (PLC) gamma et bêta chez plusieurs types cellulaires, incluant les plaquettes, les macrophages, les cellules B et les cellules endothéliales (Shukla 1991; Chao, Tseng et al. 1993; Izumi and Shimizu 1995). Ceci résulte en la formation de seconds messagers importants tels que l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG), ce qui entraîne aussi la relâche de calcium intracellulaire produite en particulier par l'IP3.

Le récepteur du PAF peut aussi activer la voie des « Mitogen-Activated Protein Kinase » (MAPK) et ce, dans plusieurs types cellulaires, incluant les cellules épidermales (Marques, Dy et al. 2002), ainsi que les cellules de types CHO (Honda, Takano et al. 1994) et HEK 293 (Chen, Rola-Pleszczynski et al. 2003) lorsque transfectées avec un plasmide codant pour le PAFR. Parmi les MAPK connues, ERK1/2, p38 et JNK sont activées (Honda, Takano et al. 1994; Nick, Avdi et al. 1997; Maruoka, Hashimoto et al.

2000; Miike, Kurasawa et al. 2000) par une stimulation au PAF. Le patron d'activation de ces kinases est très variable d'un type cellulaire à l'autre. L'activation de MAPK passerait par la protéine kinase C (PKC) et serait indépendante de la petite GTPase Ras dans les fibroblastes (Honda, Takano et al. 1994; van Biesen, Hawes et al. 1996). (Chen, Rola-Pleszczynski et al. 2003) ont démontré que l'activation de Erk 1/2 était indépendante de la trans-activation du récepteur de l'EGF (EGFR) dans des cellules de types HEK 293, en plus d'être indépendante de l'internalisation du récepteur ainsi que de l'activation des protéines G.

Le PAFR induit la production de PIP3 (phosphatidylinositol-tri-phosphate), qui régulerait la polarisation et la motilité cellulaires ainsi que la survie et la croissance cellulaire. Cette activation utiliserait la phosphatidylinositol-3-kinase gamma (PI3K γ), activable par les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G (G $\beta\gamma$) (Ferby, Waga et al. 1996) ou la PI3K composée des sous-unités p85/p110 (Ettinger, Lauener et al. 1996), selon le type cellulaire étudié.

Il a été démontré plus récemment que le PAFR est en mesure d'activer une voie de signalisation préférentiellement associée aux récepteurs tyrosine kinase et principalement utilisée pour la production de cytokines. En effets, plusieurs groupes ont maintenant mis en évidence l'activation des Janus kinases (JAKs) et des STATs (Signal transducers and activators of transcription) induite par le PAF (Lukashova, Asselin et al. 2001; Deo, Axelrad et al. 2002; Lukashova, Chen et al. 2003). De plus, le PAFR régule plusieurs autres molécules de signalisation telles que la phospholipase A2, la phospholipase D (PLD), la phospholipase C (PLC) de petites protéines G (Izumi and Shimizu 1995).

2.3 Désensibilisation et internalisation du PAFR

Le PAFR peut être désensibilisé de plusieurs façons. La désensibilisation homologue peut emprunter deux voies, soient la phosphorylation du récepteur (probablement par la GRK1) (Takano, Honda et al. 1994) et l'inactivation de la PLC β 3 par la PKC (Richardson, Haribabu et al. 1996). La désensibilisation hétérologue, pour sa part, serait induite par la phosphorylation du récepteur par la PKC (Ali, Richardson et al. 1994). La désensibilisation du récepteur est intimement reliée à son internalisation. L'internalisation du récepteur induite par une stimulation au PAF serait dépendante des arrestines, mais indépendante de l'activation des protéines G (Chen, Dupre et al. 2002). De plus, la queue C-terminale du récepteur jouerait un rôle important dans l'internalisation (Le Gouill, Parent et al. 1997; Ishii, Saito et al. 1998). En effet, la phosphorylation de la queue C-terminale du récepteur suite à la stimulation au PAF faciliterait, sans en être essentielle, la séquestration du récepteur de la surface cellulaire. De plus, le PAFR serait potentiellement internalisé par des puits de clathrine et les phénomènes d'internalisation et de recyclage composant la désensibilisation du récepteur sont importants pour sa resensibilisation.

2.4 Antagonistes du PAFR

Il existe trois classes d'antagonistes du PAFR. En effet, des phospholipides analogues, des produits naturels (en particulier isolés de plantes) et des composés chimiques synthétiques font tous partie de la famille d'antagonistes du PAFR (Izumi and Shimizu 1995). Alors que les composés analogues agissent en inhibant, par compétition, la liaison du PAF à son récepteur, certains autres antagonistes agissent plutôt par modification de l'activité ou de la sécrétion de PAF-AH. Certains des

antagonistes du PAFR ont été utilisés lors de maladies inflammatoires (Peplow 1999)
et un résumé de leurs effets est présenté au tableau 2.

Disease/disorder	Model/species	Antagonist	Parameters affected	References
<i>Cardiovascular disease</i> vascular disease	Cigarette-smoke exposure; hamster	WEB 2170	Inhibition of leukocyte adhesion to vascular wall and formation of leukocyte-platelet aggregates	102
<i>Respiratory disease</i> asthma	Human	SR-27417A	Attenuated the late asthmatic response; no effects on early asthmatic response, allergen-induced airway responsiveness, or baseline lung measurements	103
asthma	Human	WEB 2086	Reduction in inhaled corticosteroid dosage during treatment phase	104
mild and moderate asthma	Human	WEB 2086	Higher clinical improvement than after treatment with placebo	105
<i>Digestive disease</i> TNB-induced colitis	Isolated left colon perfusion, intra-colonic administration of TNB; rabbit	WEB 2170	Inhibition of PAF release	106
<i>Renal disease</i> renal ischemia	Experimental interruption of blood flow to both kidneys; rat	Ro 24-4736	Renal function less impaired and histological abnormalities less pronounced compared with postischemic kidneys from vehicle-treated animals	107
	4 h cold renal ischemia/ reperfusion in presence of neutrophils; rat	BN 52021	Increased plasma flow rate, GFR and Na ⁺ reabsorption compared to kidneys reperfused without antagonist	108
<i>Pancreatic disease</i> acute pancreatitis	Human	Lexipafant	Reduced incidence of organ failure and total organ failure at the end of treatment	109
acute pancreatitis	Pancreatitis induced by microvascular ischemia; male rat	BB 882	Reduced the rise in serum amylase activity compared with controls and improved pancreatic histology score	110
diabetes	Alloxan-induced diabetes; mouse	SR-27388	Antagonist protected against alloxan-induced diabetes	111
<i>Immunologically-related disease</i> rheumatoid arthritis	Human	BN 50730	Improvement of clinical indicators when antagonist given at 40 mg × 2/day for 28 days; no improvement in clinical and biological indicators when antagonist given at 40 mg × 2/day for 84 days	112,113
<i>Systemic inflammatory response syndrome</i> lung injury	Postperfusion lung injury following cardiopulmonary bypass; dog	CV-3988	Antagonist had protective effect	114
sepsis	Endotoxin-induced sepsis; rat	SM-12502	Antagonist prevented endotoxin-induced increases in pulmonary vascular permeability and histological changes	115
sepsis	Endotoxin-induced sepsis; mouse	SR-27388	Antagonist provided complete protection against endotoxin-induced lethality	111
gram-negative sepsis	Human	BN 52021	Antagonist reduced the mortality	117,118

Tableau 2. Effets de différents antagonistes du PAFR
(Peplow, 1999)

Partie 3. Radeaux lipidiques et caveolae

3.1 Définition des radeaux lipidiques

En 1972, Singer et Nicolson décrivaient la membrane plasmique comme une bicouche lipidique, sorte de mosaïque fluide dans un état liquide-cristallin et permettant une diffusion latérale rapide. Ce modèle membranaire contiendrait des protéines distribuées de façon uniforme, tels des icebergs dans un océan de lipides (Singer and Nicolson 1972; Galbiati, Razani et al. 2001). Ensuite, des années 1990 à aujourd'hui, plusieurs travaux ont émergé concernant d'autres états possibles de la membrane plasmique. Ces états membranaires, liquides-ordonnés, seraient enrichis en cholestérol et en sphingolipides, ce qui contribuerait à leur insolubilité par des détergents non-ioniques à faible température. Ces microdomaines membranaires, décrits comme des « radeaux lipidiques », sont aussi connus sous les appellations suivantes : DIGs (detergent-insoluble glycolipid-rich domains), GEMs (glycolipid-enriched membranes) et LDTIs (low-density Triton-insoluble complexes). Selon la conférence de l'EURESCO sur les radeaux lipidiques, tenue en Espagne en 2001 (Galbiati, Razani et al. 2001), il existerait plusieurs classes de ces microdomaines lipidiques chez les cellules de mammifères. En plus des radeaux lipidiques classiques, qui ne possèdent pas de protéines de structure spécifique, les microdomaines lipidiques pourraient contenir une protéine structurale spécifique qui conférerait au radeau des propriétés morphologiques et fonctionnelles tout à fait différentes. La première protéine de structure identifiée fut la cavéoline-1 et les domaines lipidiques associés sont appelés caveolae. Parmi les autres protéines modifiant les radeaux lipidiques, on compte les flotillines 1 et 2, aussi appelées reggies ou cavatellines, les protéines LAT/PAG, MAL/BENE, les stomatines et VIP36.

3.2 Définition des caveolae

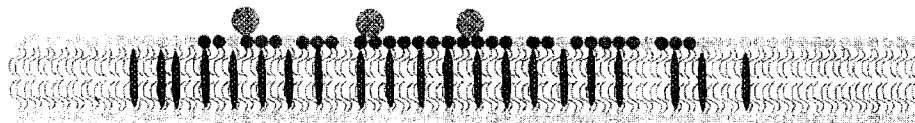
La découverte morphologique des caveolae a été faite en 1968 (Bruns and Palade 1968; Williams and Lisanti 2004). Ces invaginations de la membrane plasmique sont ancrées au cytosquelette d'actine (Stahlhut and van Deurs 2000) et leur diamètre peut varier de 50 à 100 nm (Figure 6). Elles sont retrouvées en abondance chez les fibroblastes, les adipocytes, les cellules endothéliales, les pneumocytes de type 1, les cellules épithéliales et les cellules des muscles lisse et strié. Les caveolae peuvent être considérées comme un sous-type de radeaux lipidiques, ces derniers leur servant de précurseurs et facilitant l'insertion cholestérol-dépendante des cavéolines à la membrane et ce, au niveau du Golgi (Galbiati, Razani et al. 2001).

Certains résultats permettent de penser que quelques protéines seraient localisées spécifiquement dans les caveolae ou dans les radeaux lipidiques, mais pas dans ces deux types de domaines (Liu, Oh et al. 1997), ce qui laisse penser que la cavéoline, en plus de son rôle de structure, pourrait influencer le recrutement de protéines au sein des caveolae.

L'isolement des caveolae est basée sur leur densité de flottaison et leur résistance à la solubilisation par des détergents non-ioniques à faible température et peut être faite de plusieurs façons (Chang, Ying et al. 1994; Lisanti, Scherer et al. 1994; Lisanti, Scherer et al. 1994; Lisanti, Tang et al. 1995; Smart, Ying et al. 1995; Lisanti, Sargiacomo et al. 1999). Cependant, ces diverses méthodes ne permettent pas de discriminer entre les caveolae et les radeaux lipidiques, ce qui rend l'étude comparative de ces domaines membranaires difficile. De façon générale, pour discriminer entre les caveolae et les radeaux lipidiques de type classique, les investigateurs recherchent une interaction spécifique entre la cavéoline et une protéine d'intérêt, ce qui leur permet de suggérer une

association préférentielle de cette molécule avec les caveolae, sans toutefois permettre d'exclure une association avec les radeaux lipidiques classiques.

LIPID RAFTS



CAVEOLAE

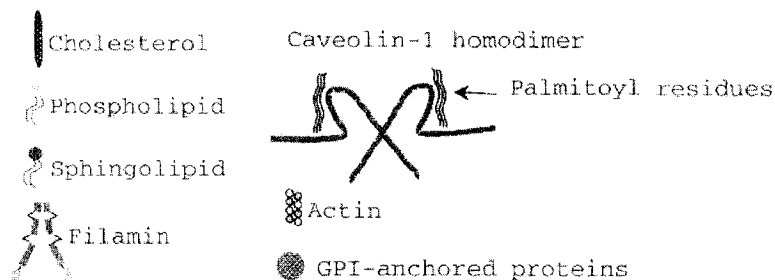
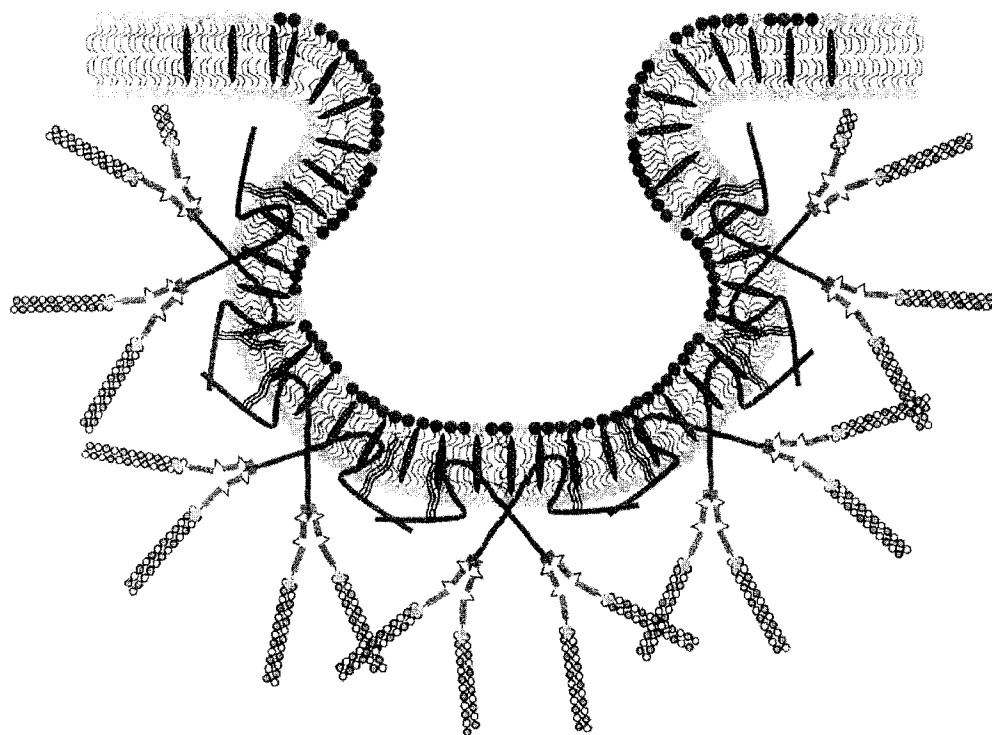


Figure 5. Radeau lipidique et caveolae (Quest *et al.* 2004)

3.2.1 Membres de la famille des cavéolines

En tant que composante structurale des caveolae, la cavéoline-1 a été le premier membre de la famille des cavéolines à être découvert (Rothberg, Heuser et al. 1992). Son clonage initial a été effectué chez le chien et le poulet (Glenney and Soppet 1992; Kurzchalia, Dupree et al. 1992). La découverte de la cavéoline-2 a ensuite suivi (Scherer, Okamoto et al. 1996). Cette dernière protéine colocalise et est capable de former des hétéro-oligomères avec la cavéoline-1. De plus, la cavéoline-2 est souvent coexprimée dans plusieurs types cellulaires avec son homologue et nécessite la cavéoline-1 pour être proprement insérée dans la membrane (Scherer, Lewis et al. 1997; Parolini, Sargiacomo et al. 1999). La cavéoline-3 est le dernier membre de la famille à avoir été découvert et est retrouvée exclusivement chez les cellules de type musculaire (Way and Parton 1995; Tang, Scherer et al. 1996). Les gènes codant pour les cavéolines 1 et 2 sont situés sur le même chromosome (7q31.1), sur un site fragile fréquemment effacé dans divers cancers humains alors que la localisation chromosomique de la cavéoline-3 est différente (Engelman, Zhang et al. 1998; Engelman, Zhang et al. 1999). Les cavéolines sont de petites protéines de 18 à 24kDa et seule la cavéoline-1 possède deux isoformes, soient alpha et bêta (Scherer, Tang et al. 1995).

3.2.2 Clonage de la cavéoline-1

Tel que mentionné précédemment, la cavéoline-1 a été clonée par plusieurs groupes de recherche. Lors de mes travaux de maîtrise, j'ai effectué le clonage de la cavéoline-1 à partir d'extraits d'ARN totaux de cellules HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells). La protéine a été insérée dans 4 vecteurs différents, soit un

vecteur de clonage (pGEM3Z), un vecteur d'expression (pCDNA3) et 2 vecteurs servant pour la technologie de BRET2 (pRLucN3 (h) et pGFP2 N3 (h)). Les stratégies de clonage utilisées sont décrites dans l'article ci-joint.

3.2.3 Caractérisation des différents domaines de la cavéoline-1

Beaucoup de travaux ont été accomplis jusqu'ici pour mieux comprendre le rôle de la cavéoline-1 au sein de la membrane plasmique. Pour ce faire, plusieurs groupes ont tenté de décortiquer la protéine en divers fragments, pour ensuite leur attribuer une fonction. La cavéoline-1 comporte 178 acides aminés et plusieurs domaines sont maintenant bien connus au sein de cette protéine. Par exemple, on sait que les acides aminés 61-101 sont importants pour la formation d'homo-oligomères de 14 à 16 monomères (Sargiacomo, Scherer et al. 1995), que les acides aminés 168-178 sont impliqués dans l'interaction entre les oligomères et que les acides aminés 102-134 sont importants pour l'interaction avec la cavéoline-2 (Das, Lewis et al. 1999). Pour leur part, les acides aminés 135-150 sont impliqués dans l'attachement de la protéine avec la membrane plasmique et sa localisation au trans-Golgi et les acides aminés 82-101 sont aussi importants pour l'attachement à la membrane et la localisation spécifique au sein des caveolae (Schlegel and Lisanti 2000). Certains auteurs vont même jusqu'à proposer que la cavéoline-1 se lierait à la membrane par l'insertion d'une courte séquence (YWFY), située entre les acides aminés 82-101, dans le feuillet interne ainsi que par les interactions électrostatiques des résidus chargés environnants (KYWFYR) avec les têtes chargées des phospholipides (Woodman, Schlegel et al. 2002). Finalement, les acides aminés 135-156 seraient impliqués dans l'inhibition de certaines protéines, incluant eNOS, c-Src et PKA

(Venema, Ju et al. 1997; Razani, Rubin et al. 1999) alors que les acides aminés 82-101 sont importants pour la liaison de la cavéoline-1 avec plusieurs autres protéines, dont des molécules de signalisation. Ce dernier tronçon de protéine représente ce qui est communément appelé le domaine d'échafaudage de la cavéoline-1. En 1997, un motif potentiel de liaison à la cavéoline-1 a été découvert, motif retrouvé sur plusieurs protéines interagissant physiquement avec la cavéoline-1 via le domaine d'échafaudage de la protéine (Tableau 3). Ce motif à prépondérance d'acides aminés aromatiques (Trp, Phe, Tyr) séparés de façon caractéristique peut être retrouvé sous 3 façons différentes, soient $\phi x \phi x x x x \phi$, $\phi x x x x \phi x x \phi$ ou une combinaison des deux, $\phi x \phi x x x x \phi x x \phi$, où ϕ est un acide aminé aromatique et x est un résidu aléatoire (Couet, Li et al. 1997).

Protein ^a	1st residue ^b	Caveolin binding motif ΦXΦXXXXΦXXΦ sequence	Ref.
Cytoplasmic signaling molecules			
G _α subunits ^c	190	<u>F</u> T <u>E</u> KDLH <u>F</u> K <u>M</u> <u>F</u>	(5, 6, 7, 38)
PKC-α ^{c,d}	656	<u>F</u> S <u>Y</u> VNP <u>Q</u> <u>F</u>	(6, 15)
Src-like kinases ^{c,d}	425	<u>W</u> S <u>F</u> GILLY	(5, 6, 10, 39)
Endothelial NOS ^c	347	<u>F</u> P <u>A</u> A <u>P</u> F <u>S</u> G <u>W</u>	(40, 41)
MAP kinase ^c	124	<u>Y</u> I <u>V</u> G <u>F</u> <u>Y</u> C <u>A</u> <u>F</u>	(6)
Actin-cytoskeleton related			
Myosin HC ^{c,d}	827	<u>W</u> P <u>W</u> M <u>K</u> L <u>Y</u> <u>F</u>	(6)
Dystrophin ^d	2108	<u>F</u> H <u>Y</u> D <u>I</u> K <u>I</u> <u>F</u> N <u>Q</u> <u>W</u>	(42)
G-protein-coupled receptors			
β-AR ^c	359	<u>F</u> V <u>F</u> F <u>N</u> W <u>L</u> G <u>Y</u>	(21)
Endothelin R (ET _A)	146	<u>W</u> P <u>F</u> D <u>H</u> N <u>D</u> <u>F</u> G <u>V</u> <u>F</u>	(8)
mAcR ^c	422	<u>W</u> T <u>I</u> G <u>Y</u> W <u>L</u> C <u>Y</u>	(18)
Growth-factor receptors			
EGF-R	898	<u>W</u> S <u>Y</u> G <u>V</u> T <u>V</u> <u>W</u>	(15)
Insulin-R	1220	<u>W</u> S <u>F</u> G <u>V</u> V <u>F</u> <u>W</u>	(43)
PDGF-R ^c	887	<u>W</u> S <u>F</u> G <u>I</u> L <u>L</u> W <u>B</u> I <u>F</u>	(44)
Channels			
Aquaporin-1 ^c	210	<u>W</u> I <u>F</u> W <u>V</u> G <u>P</u> <u>F</u>	(45)
IP ₃ -sensitive Ca ²⁺ channel	2452	<u>Y</u> L <u>F</u> S <u>I</u> V <u>G</u> <u>Y</u> L <u>F</u> <u>F</u>	(46)
Others			
Caveolin ^c	92	<u>F</u> T <u>V</u> T <u>K</u> <u>Y</u> W <u>F</u> <u>Y</u>	(12, 13)
NSF	138	<u>F</u> S <u>F</u> N <u>E</u> K <u>L</u> <u>F</u>	(38)
Cholera toxin A subunit	138	<u>Y</u> G <u>W</u> <u>Y</u> R <u>V</u> H <u>F</u>	(18)

^a PKC, protein kinase C; HC, heavy chain; AR, adrenergic receptor; ET_A, endothelin A; EGF-R, epidermal growth factor receptor; insulin-R, insulin receptor; PDGF-R, platelet-derived growth factor receptor; IP₃, inositol triphosphate.

^b First residue of the motif in the protein sequence.

^c The caveolin binding motif is present in other members of the protein family.

^d More than one possible caveolin binding motif in the protein.

Tableau 3. Protéines possédant un domaine de liaison à la cavéoline-1

(Couet *et al.* 1997)

3.3 Rôles des caveolae et des radeaux lipidiques

Au fil des études, on attribue de plus en plus de rôles à ces microdomaines membranaires. Bien que les caveolae soient des domaines relativement immobiles (Thomsen, Roepstorff et al. 2002), on leur attribue toutefois un rôle dans l'internalisation (non constitutive) de quelques récepteurs, mais surtout, de certaines souches d'*Escherichia coli*, du Simian virus 40 (SV40) (Norkin 2001), ainsi que de la toxine du choléra et celle du tétanos (Montesano, Roth et al. 1982). Puisque les protéines liées au GPI sont capables de s'associer et de se concentrer spontanément au sein des caveolae (van den Berg, Cinek et al. 1995), ces domaines membranaires pourraient être la cible de protéines liées au GPI que possèdent certains parasites, incluant *Plasmodium*, *Trypanosoma*, et *Leishmania* (Tachado, Gerold et al. 1996; Tachado, Gerold et al. 1997; Anderson 1998). *Chlamydia trachomatis* serait aussi internalisé par les caveolae (Harris, Werling et al. 2002). La cavéoline-1 est aussi un élément essentiel dans l'homéostasie du cholestérol, dans la suppression de tumeurs, la régulation négative de la prolifération cellulaire et les caveolae sont impliquées dans le trafic de vésicules ainsi que dans la transcytose (Williams and Lisanti 2004).

Plusieurs éléments de signalisation intracellulaire étant retrouvés de façon prédominante au sein des radeaux lipidiques et des caveolae, ces domaines représentent des plateformes de signalisation intéressantes, par compartimentalisation et concentration de molécules de signalisation et de récepteurs. C'est ce que l'on appelle « The Caveolae Signaling Hypothesis » (Lisanti, Scherer et al. 1994). La cavéoline-1, est en effet responsable de la localisation de plusieurs de ces molécules au sein des caveolae et ce, via son domaine d'échafaudage, qui se lie au motif de résidus aromatiques mentionnée

précédemment. Ce motif est d'ailleurs retrouvé chez plusieurs récepteurs couplés aux protéines G, des récepteurs de facteurs de croissance, certains canaux ioniques, des molécules de signalisation et des membres du cytosquelette (Tableau 3). Dans une revue récente sur les caveolae et la transduction de signaux (Krajewska and Maslowska 2004), il est mentionné que la cavéoline-1 interagit avec ou régule plusieurs molécules de signalisation, dont Fak, les sous-unités alpha des protéines G, les GRKs 1, 2 et 5, MEK, ERK, PI3K, PKC, PLC, PLD et la famille des Src kinases (Fyn, Lck, Lyn, Yes). Ces protéines ont ceci en commun : elles sont toutes recrutées, ou activées par le PAFR. De plus, les caveolae auraient un rôle important à jouer dans la mobilisation de calcium. Il est bien connu que lors d'activation, certains GPCRs (tel le PAFR), vont produire de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3), l'IP3 allant directement se lier sur son récepteur (IP3R) pour induire la relâche de calcium intracellulaire (Patel, Joseph et al. 1999). Il a été démontré qu'une molécule semblable à l'IP3R est localisée dans les caveolae des cellules endothéliales, des cellules du muscle lisse et des kératinocytes (Fujimoto, Nakade et al. 1992). De plus, les caveolae seraient enrichies en calcium-ATPase (Fujimoto 1993) et on aurait plus récemment retrouvé de la cavéoline dans un complexe composé entre autres de $G\alpha_q/11$, de la $PLC\beta$, de l'IP3R et de Ca^{2+} -ATPase (Lockwich, Liu et al. 2000), démontrant que plusieurs des molécules clés de la régulation du calcium sont retrouvées au sein des caveolae. En résumé, bien que les caveolae et les radeaux lipidiques soient impliqués dans plusieurs fonctions, la grande proportion de molécules de signalisation concentrées dans ces domaines contribue à faire de ces régions membranaires des plates formes de signalisation très importantes.

Objectifs et stratégies

Les caveolae et les radeaux lipidiques sont reconnus pour concentrer plusieurs molécules de signalisation intracellulaire ainsi que certains récepteurs, dont des GPCRs, au sein de microdomaines de la membrane plasmique, de façon à former des plateformes de signalisation prédéfinies. En 1999, une équipe de recherche démontrait, par microscopie électronique, que le PAFR pouvait être localisé très près des caveolae chez les cellules endothéliales (Ihida, Predescu et al. 1999). Étant donné que le PAFR possède une séquence potentielle de liaison à la cavéoline-1, protéine intégrale des caveolae, les objectifs des présents travaux de recherche étaient de déterminer, dans un premier temps, si le PAFR pouvait être localisé au sein des caveolae ou des radeaux lipidiques chez certains types cellulaires, puis, le cas échéant, tenter de déterminer l'implication d'une telle localisation sur la signalisation intracellulaire du PAFR.

Nous avons donc tenté de vérifier, par extraction de radeaux lipidiques et de caveolae, la présence du PAFR dans ces microdomaines membranaires. Pour ce faire, l'utilisation de cellules humaines de types HEK 293, les cellules de Hamster (CHO) et de singe (COS-7) ont été utilisées pour surexprimer les protéines d'intérêt et des cellules de type A431 (lignée de kératinocytes humains) et Ramos (lignée de cellules B humaines) ont été utilisées pour vérifier nos observations dans des cellules exprimant toutes deux le PAFR de façon endogène, à la différence d'exprimer (A431) ou non (Ramos) la cavéoline-1. Pour les systèmes de surexpression, le PAFR obtenu du Dr. Ye (Parent, Le Gouill et al. 1996) a été étiqueté c-Myc au laboratoire (Le Gouill, Parent et al. 1997). Le clonage de la cavéoline-1 a été effectué lors des présents travaux de recherche.

Puisque, tel que mentionné dans l'introduction, les méthodes actuelles d'isolement de microdomaines lipidiques ne permettent pas de différencier les caveolae des radeaux lipidiques de type classique, nous devons trouver un moyen autre pour tenter de déterminer la localisation du PAFR au sein des caveolae, des radeaux lipidiques ou des deux. Pour ce faire, des études de coimmunoprécipitation du PAFR et de la cavéoline-1 ainsi que l'utilisation de la technologie de BRET2, en système de surexpression, ont été utilisées pour vérifier l'association physique des deux protéines. L'étude comparative des cellules possédant ou non des caveolae a aussi été utilisée à cette même fin.

Étant donné que plusieurs des molécules de signalisation utilisées par le PAFR sont aussi retrouvées en association avec les caveolae et les radeaux lipidiques, l'implication fonctionnelle de la localisation du PAFR au sein de ces microdomaines a été vérifiée pour certaines de ces protéines de signalisation. En effet, l'utilisation de la méthyl- β -cyclodextrine comme agent séquestrant le cholestérol a été utilisée pour altérer l'environnement lipidique des microdomaines. L'activation des protéines G α q/11 et ERK1/2 a été vérifiée suite à un prétraitement des cellules avec la cyclodextrine, via la mobilisation de calcium intracellulaire, la production d'inositol phosphate et la phosphorylation des protéines ERK1 et ERK2. Finalement, en dernier lieu, nous avons tenté de déterminer le rôle que pouvait jouer les radeaux lipidiques et les caveolae dans la production d'interleukine-8, une chimiokine importante pour le recrutement de cellules du sang lors d'inflammation. Ceci a été déterminé à l'aide d'essais luciférase, toujours en prétraitant les cellules avec la cyclodextrine pour altérer les micros domaines lipidiques.

Avant-propos de l'article

Les expériences présentées dans l'article intitulé « Platelet-Activating Factor Receptor Association with Caveolae and Lipid Rafts : Implications in Signal Transduction and Interleukin-8 Production » ont été effectuées en grande majorité par Caroline Poisson. À noter que la portion C de la figure 3 a été effectuée par Simon Rollin et que les portions A et B de la figure 5 ont été faites à partir d'expériences effectuées par Simon Bousquet. L'écriture de l'article a été effectuée en totalité par Caroline Poisson, et ce, sous la supervision du Dr Rola-Pleszczynski. Cet article sera soumis prochainement au *Journal of Biological Chemistry* pour publication.

**Platelet-Activating Factor Receptor Association with Caveolae and Lipid Rafts :
Implications in Signal Transduction**

Caroline Poisson¹, Simon Rollin¹, Simon M. Bousquet², Christian Le Gouill¹, Guylain Boulay², Jana Stankova¹, Marek Rola-Pleszczynski¹

From the ¹Immunology Division, Department of Pediatrics, and ²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, J1H 5N4, Canada

Running Title : PAFR association with caveolae and lipid rafts

Address correspondence to :

Marek Rola-Pleszczynski, MD, Immunology Division, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC Canada J1H 5N4

Telephone: 819-346-1110, ext. 14851

FAX: 819-564-5215

e-mail: marek.rola-pleszczynski@usherbrooke.ca

Platelet-activating factor (PAF) is a very potent inflammatory mediator implicated in many pathophysiological conditions. Its receptor, PAFR, is a member of the G-protein-coupled receptor superfamily. Caveolae and lipid rafts are known to be enriched in certain proteins, including receptors and signaling molecules. Caveolin-1, the major structural protein of caveolae, specifically interacts with many signaling molecules and, thus, caveolae and lipid rafts are often seen as preassembled signaling platforms. A potential binding site for caveolin-1 is present in the PAFR sequence and many downstream signaling components of PAFR activation preferentially localize in caveolae. The aim of this study was to investigate whether the PAFR was localized in caveolae/lipid raft domains and, if so, what would be the significance of such localization for PAFR signaling. Here we demonstrate that PAFR is indeed preferentially localized within membrane microdomains and that it physically interacts with caveolin-1 in living cells, potentially through a

caveolin-1 binding sequence in its C-terminal tail. Caveolin-1 however is not essential for PAFR localization in lipid rafts. Disruption of caveolae/lipid rafts with methyl- β -cyclodextrin markedly reduced PAF-triggered inositol phosphate production and cytosolic calcium flux, suggesting that PAFR signaling through the Gq protein was critically dependent on integrity of lipid rafts and caveolae. Interestingly, whereas in caveolin-1-expressing cells lipid raft disruption markedly decreased PAFR-mediated activation of the ERK/MAPK pathway, in cells lacking caveolae, lipid raft disruption had the opposite effect and enhanced PAFR capacity to signal through the ERK/MAPK pathway. In conclusion, PAFR appears to preferentially locate within caveolae or lipid rafts and this location is important for specific signaling events.

Introduction

Platelet-activating factor (PAF) (1-*O*-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) is a very potent inflammatory mediator and was the first

bioactive phospholipids to be characterized structurally (1). It mediates its actions upon binding to the PAF receptor (PAFR), a member of the G-protein-coupled receptor superfamily (2). PAF and PAFR are known to play an important role in many pathophysiological disorders, including anaphylaxis, bronchial asthma, endotoxic shock, atherosclerosis, streptococcal infection, skin diseases and disorders of the central nervous system (3). PAFR has been the object of extensive research in the last 10 years and some of the signaling pathways used by this receptor have been defined, although variations have been reported depending on cell types and methodologies, as reviewed in (4). Activation of the G α q/11 G-protein subunits, phosphorylation of p42/p44 MAPK and elevation of intracellular calcium levels are, however, quite well established signaling pathways triggered by this receptor. The structure-function relationship of the receptor has also been studied by mutagenesis and transfection systems. The latter helped reveal, amongst others, the amino acids implicated in ligand binding, stability, G-protein coupling, internalization, Jak kinase activation and phosphorylation of the PAFR in addition to proposing mechanisms for desensitization and transcriptional regulation of the receptor (5-8) (4,9). In addition, analysis of the sequence of PAFR revealed the presence of a putative binding motif for caveolin-1. Caveolin-1 is the major structural protein of caveolae, which are a subtype of lipid rafts, also described as liquid ordered domains of the plasma membrane enriched in cholesterol and glycosphingolipids. Caveolae and lipid rafts are known to be enriched in certain proteins moieties, including receptors and signaling molecules. It has been demonstrated that caveolin-1

specifically interacts with many signaling molecules such as Erk1/2 (10), Src (11-13), Ras (14), PKC (15), and several G-protein α subunits (16) through its scaffolding domain. This domain is located between amino acids 82-101 and binds to a consensus sequence on target proteins. This sequence on target proteins has been described by Couet et al. (17) as: fxfxxxxf or fxxxxfxxf derived from fxfxxxxfxxf, where f is an aromatic residue (Trp, Phe, Tyr) and x a random residue. Caveolae and lipid rafts are therefore seen, in many cell types, as preassembled signaling complexes for many receptors, including GPCRs.

Given the presence of a potential binding site for caveolin-1 in the PAFR sequence (aa 293-300: YxFxxxxF) and the many downstream signal components of the PAFR activation cascade that are preferentially localized in caveolae, the aim of this study was to investigate whether the PAFR was localized in caveolae/lipid raft domains and, if so, what would be the significance of such localization for PAFR signaling.

Lipid raft isolation from different cell types was performed to assess the localization of PAFR and methyl- β -cyclodextrin, a chelator of cholesterol, was used to disrupt lipid rafts before determining the ability of the receptor to trigger the production of inositol phosphates, to enhance intracellular calcium levels, to activate Erk1/2 MAPK and to induce interleukin-8 transcription in these cell types. Here, we show that PAFR is localized to caveolae/lipid rafts in HEK 293, CHO, A431 and Ramos cell lines and demonstrate a physical interaction between PAFR and caveolin-1. Our results with cyclodextrin suggest an important role for the association of PAFR with lipid rafts for appropriate signalization through the inositol phosphate, calcium and Erk pathways

Experimental Procedures

Materials—Reagents were obtained from following sources: oligonucleotides were synthesized at Sigma Genosys (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada). Bovine serum albumin (BSA), methyl- β -cyclodextrin (CD), 2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid (MES), leupeptin, aprotinin, soybean trypsin inhibitor, AEBSEF, Na₃VO₄, HBSS and protein A-sepharose were from Sigma-Aldrich. Calyculin A was from Biomol International L.P. (Plymouth Meeting, PA). D-MEM High Glucose, D-MEM/F-12, RPMI, Fura2, and pcDNA3 vector were from Invitrogen (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). ³H-WEB2086, and DeepBlueC were from PerkinElmer (PerkinElmer BioSignal, Inc., Montreal, QC, Canada). pGEM-3Zf(+) vector was from Promega (Fisher Scientific Ltd. Nepean, ON, Canada). Nitrocellulose transfer membrane, AG1-X8 resin and Poly-prep columns were from Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Myo-[³H]inositol was from Amersham (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ). D-MEM High Glucose without inositol was from United States Biological (United States Biological, Swampscott, MA). FuGENE6 Transfection Reagent was from Roche (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN). PAF C-16 was from (Calbiochem, San Diego, CA). Penicillin/Streptomycin solution was from Wisent Bioproducts, St-Bruno, QC, Canada. D-luciferin was from Cedarlane Laboratories Ltd., Hornby, ON, Canada. Mouse monoclonal anti-HA antibody was from BioCan Scientific (Montréal, QC, Canada). Mouse anti-flotillin-1 antibody was from BD Biosciences (Mississauga,

ON, Canada). Goat anti-PAFR, rabbit anti-caveolin-1, rabbit anti-HA, rabbit anti-c-Myc, mouse anti-p-ERK and rabbit anti-ERK antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). IL-8 promoter coupled to a luciferase reporter gene was kindly provided by Dr Allan R. Brasier, from Department of Internal Medicine, University of Texas Medical Branch. pGFP2-N3(h) and pRLUC-N3(h) vectors, originally from PerkinElmer, were a kind gift from Dr Terry Hébert (Institut de Cardiologie de Montréal, Canada). WEB2086 was kindly provided by Dr Hubert Heuer (Boehringer Ingelheim KG, Department of Pharmacology).

Cell Culture, Transfections and Stimulations—All cell cultures were originally from the American Type Culture Collection (ATCC). HEK 293, Ramos, and A431 cells were respectively cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) High Glucose, RPMI and D-MEM/F-12 containing 100mg/mL penicillin and 100 IU streptomycin and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma). CHO cells were cultured in D-MEM/F-12 supplemented with 5% FBS. FuGENE6 Transfection Reagent was used for all transfections according to the manufacturer's instructions. Before all stimulations, cells were starved (0.1% FBS) overnight and stimulations were always conducted in medium containing 0.1% BSA.

Caveolin-1 Cloning—Caveolin-1 was cloned from HUVECs total RNA extract. Reverse-transcription PCR was performed to obtain cDNAs and a final PCR reaction was performed to obtain caveolin-1 using following primers: 5'-GAGGGTACCGGCACCATGTCTGG GGGCAAATAC-3' and 5'-CTCGG ATCCCCTATTTCTTTCTCGAAGTT GATGCG-3'. Caveolin-1 was then

transferred into pGEM-3Zf(+) vector using KpnI and BamHI restriction enzymes. Caveolin-1 from pGEM-3Zf(+) was HA-tagged with annealed primers: 5'-GATCCGGGCTATCCGTACGATGTGCCGGATTATGCCGCTAGCG-3' and 5'-TCGACGCTAGCCGGCATAATCCGGGCACATCGTACGGATAGCCCG-3' using BamHI and SalI restriction sites. For transfection experiments, caveolin-1-HA was excized from pGEM-3Zf(+) vector using EcoRI and NheI and subcloned into pcDNA3 vector using EcoRI and XbaI. For BRET2 experiments, caveolin-1-HA from pGEM-3Zf(+) vector was subcloned into pGFP2-N3(h) and pRLUC-N3(h) vectors using KpnI and BamHI restriction enzymes.

Caveolae Isolation—Caveolae isolation was conducted according to the method of Smart *et al* (réf) with slight modifications. Briefly, appropriate cell numbers were stimulated with 1×10^{-8} M PAF in medium containing 0,1% BSA for indicated time and lysed in 800 mL of sodium carbonate buffer (500mM sodium carbonate, 1mM leupeptine, 10mg/mL sybean trypsin inhibitor, 2mg/mL aprotinin, 100mg/mL AEBSF, pH 11) on ice for 30 minutes. Cell lysates were then sonicated and mixed with an equal volume of sucrose 90% in 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid-buffered solution (MBS) (25mM 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid (MES), 150mM NaCl, pH 6,5), overlaid with 1,6 mL of sucrose 35% in MBS containing 250mM sodium carbonate, overlaid with 1,6 mL 5% sucrose in same buffer. Preparations were then centrifuged at 40 000 rpm for 16-20 hours at 4°C in Optima Max Ultracentrifuge from Beckman Coulter, using MLS 50 rotor. Twelve fractions of

400mL each were gently collected from the top of the tube and proteins were precipitated with 5% perchloric acid. Pellets were then resuspended in Laemmli buffer and subjected to SDS-PAGE and Western Blot for protein analysis. The same method was used to isolate lipid rafts from the Ramos cell line, but sodium carbonate buffer was replaced by a Hepes solution containing 1% Triton X-100 and cell lysates were layered on 40%, 30% and 5% sucrose in Hepes buffer.

Coimmunoprecipitation—HEK293 cells were transiently transfected with indicated cDNAs and 48 h post-transfection, cells were lysed in 0,5mL of immunoprecipitation buffer (PBS 1% Triton X-100, 0,5% NP-40, 5mM EDTA, 1mM leupeptine, 10mg/mL soybean trypsin inhibitor, 2mg/mL aprotinin, 100 mg/mL AEBSF, 1mM Na₃VO₄, 10mM NaF, 10nM calyculin A). Lysates were precleared with 50mL of protein A-Sepharose bead suspension at 4°C with continuous rotation for one hour. Lysates were then centrifuged at 13 000 rpm for 10 minutes and the precleared lysates were incubated with indicated antibodies overnight at 4°C. Thirty mL of BSA-treated bead suspension were then added and incubated for 2 h at 4°C. After incubation, beads were washed several times with buffer and proteins were eluted from beads by addition of 4X SDS sample buffer, resolved by SDS-PAGE and subjected to Western blot analysis using goat anti-PAFR and rabbit anti-Caveolin-1 antibodies (Santa-Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA).

BRET2 Experiments—For BRET2 experiments, HEK 293 cells were seeded in 6 well plates and transfected

with indicated constructs. 48 hours post-transfection, cells were harvested, washed in PBS, resuspended in BRET2 buffer (PBS, 1g/L glucose, 1mM ascorbic acid) and transferred into 96 well plates for BRET2 analysis on a Perkin-Elmer Fusion spectrometer. Background was determined by reading the plate once without substrate. BRET2 signal was then recorded, after adding 5mM DeepBlueC, using the following settings: Gain to 100, Voltage to 1100, Emission Filter 1 to 410nm and Emission Filter 2 to 515 nm.

Inositol Phosphate Determination—HEK 293 were seeded in 6 well-plates and transfected with c-Myc-tagged PAFR cDNA. 24 h post-transfection, medium was substituted for DMEM High Glucose without inositol containing 3mCi Myo-[³H]Inositol and 0,2% FBS. Forty eight hours post-transfection, cells were pretreated or not with 10mM methyl- β -cyclodextrin for 30 minutes at 37°C. Medium was removed and replaced by fresh medium containing 20mM LiCl and 0,1% BSA for 2 to 10 minutes at 37°C and cells were stimulated with indicated concentrations of PAF or ethanol (EtOH) for 5 to 15 minutes at 37°C. Reactions were stopped by adding perchloric acid and leaving plates on ice for 30 minutes. Inositol phosphates were extracted and separated on AG1-X8 resin. Total labeled inositol phosphates were then counted by liquid scintillation in an LKB-Wallac b counter.

Intracellular Calcium Mobilization—⁶Ramos cells (5-10x10⁶) were spun and resuspended in buffer (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄, 0,5 mM MgCl₂, 5,56 mM glucose, 25 mM Hepes, pH 7.3) containing 0.1% FBS

and incubated with indicated concentrations of CD or PBS for 30 minutes at 37°C. Cells were centrifuged and resuspended in buffer containing 3mM Fura2AM (Invitrogen) for 15 minutes at 25°C, washed, and resuspended in 1 mL of buffer for Fura2 hydrolysis at 25°C for 1 to 1,5 h. After incubation, cells were washed twice in buffer and intracellular fluorescence was recorded at 37°C using a Hitachi F-2500 fluorescence spectrophotometer (Chromabec HPLC Inc., St-Laurent, QC, Canada) with the following settings : 340nm EX WL, 510nm EM WL, 400V, EX Slit 5nm, EM Slit 10nm, 600 seconds recording time. Cells were stimulated with 100nM PAF. Triton X-100 and EGTA solution (100mM Tris, 125mM EGTA, pH 9.0) were used to determine maximal and minimal fluorescence values respectively. Calcium mobilization (nM) was calculated using FL Solutions software.

Intracellular Calcium Mobilization (Microscopy)—Based on previously published methods (18,19), A431 cells were seeded on coverslips and allowed to adhere. Cells were then washed with Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) and loaded with 0,2 mM Fura2 in HBSS for 20 minutes at 25°C. Cells were washed with HBSS and pretreated or not with cyclodextrin for 30 minutes at 25°C. Cells were washed again, inserted into a circular open-bottom chamber and placed on the stage of Zeiss Axovert microscope fitted with an Attofluor Digital Imaging and Photometry System (Attofluor Inc., Rockville, MD). About 50-60 cells were selected on each coverslip for fluorescence recording. Intracellular calcium release was measured by fluorescence videomicroscopy at 25°C using alternating excitation wavelengths of 334 and 380 nm and monitoring emitted fluorescence at 520 nm. Free

²⁺
[Ca²⁺]_i was calculated from 334/380 fluorescence ratios as previously described (20). PAF was diluted to its final concentration in HBSS 0.1% BSA and applied to cells by surface perfusion.

Intracellular Signaling—HEK 293 cells were seeded in 6 wells plates and transfected with plasmid encoding c-Myc-tagged PAFR 48 h before experiment. One 100mm petri dish of A431 and 5x10⁶ Ramos were used for each time point. For all cell types, stimulations were conducted for 5 minutes at 37°C with 10nM PAF or EtOH after pretreatment of cells with 10mM cyclodextrin or 1x10⁻⁴ M WEB2086. Cells were then lysed in ice cold buffer (10mM Tris pH 7.4, 10mM NaCl, 3mM MgCl₂, 0.5mM EDTA, 0.5mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholate, 1mM leupeptine, 10mg/mL sybean trypsin inhibitor, 2mg/mL aprotinin, 100mg/mL AEBSF, 1mM Na₃VO₄, 10mM NaF, 10nM calyculin A). Lysates were then centrifuged and supernatants were stored at -80°C until used. Otherwise, cleared cell lysates were mixed with 4X Lemli Buffer and subjected to SDS-PAGE and Western Blot analysis using mouse anti-p-Erk1/2 antibody. Membranes were then stripped and reprobed with rabbit antiErk1 antibody (Santa-Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA).

Radioligand Binding Assay—Competition binding curves were done as previously described (21) with modifications. Briefly, experiments were done on HEK 293 cells transiently expressing the c-Myc-tagged PAFR. Cells were harvested and washed twice in PBS, pretreated with 10mM of methyl-β-cyclodextrin for 30 minutes at 37°C and then washed again with PBS.

Binding reactions were carried out in 250mL of Hepes Tyrode's buffer (140nM NaCl, 2.7mM KCl, 1mM CaCl₂, 12mM NaHCO₃, 5.6mM D-glucose, 0.49mM MgCl₂, 0.37mM NaH₂PO₄, 25mM Hepes, pH 7.4) containing 0.1% BSA.

5x10⁵ cells were incubated with 10nM of ³H-WEB2086 (PerkinElmer) and increasing concentrations of nonradioactive PAF for 90 minutes at room temperature. Reactions were stopped by centrifugation, pellets washed in Tyrode's buffer and cell-associated radioactivity was measured by liquid scintillation.

GST-Pull-Down Assay—BL21 E.coli transformed with plasmids encoding all the intracellular loops and the C-tail of PAFR, were grown to log phase at 37°C in 2x YT media with ampicillin (100μg/mL). Expression of the fusion proteins was induced with 1mM isopropyl-β-thio-D-galactopyranoside for 4 hours at 37°C. Bacterial pellets were lysed in lysis buffer (1.2M D-glucose, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH8.0, 0.1mg/mL AEBSF and 4μg/mL lysosyme) for 30 minutes on ice. For complete lysis, bacterial lysates were frozen in liquid N₂ and subsequently thawed at 60°C and put back on ice. After a 30min centrifugation at 4°C (13000 RPM), supernatants containing GST-fusion proteins were purified using glutathione-agarose beads for 3hours at 4°C. Purified GST-fusion proteins were subsequently quantified by Coomassie staining of a 10 % SDS-PAGE. 10μg of each freshly purified recombinant protein was incubated for 12 h at 4°C with cell lysate of HEK 293 cells transiently transfected with 5μg of human pcDNA-caveolin-1. Beads were pelleted and washed 3 times with ice cold RIPA (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 1% IGEPAL, 0.5% Sodium-

deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 5mM EDTA). Bound proteins were eluted with SDS-PAGE sample buffer for 20min, then heated at 60°C for 5min and stored on ice. Proteins were separated by a 10% SDS-PAGE and subjected to Western blot analysis.

Results

PAFR is localized in low density microdomains

Caveolae isolation was performed as previously described (22) on Chinese Hamster Ovary (CHO) cells stably expressing a c-MYC epitope-tagged human PAFR (21). PAFR (as revealed with anti-c-Myc antibody) was found to colocalize with caveolin-1, an integral membrane protein of caveolae (23), at the 5%-35% sucrose interface, corresponding to low density membrane domains (Figure 1A). This colocalization was also observed using HEK 293 cells transiently expressing hPAFR (Figure 1B), as revealed with an anti-PAFR antibody. To ensure specificity of this PAFR position in the sucrose gradient, similar experiments were performed on COS-7 cells transiently expressing a GFP_hPAFR construction and fluorescence was measured in each fraction (data not shown). These experiments confirmed both PAFR localization in low density membrane fractions and colocalization of PAFR with caveolin-1. We therefore looked at two cell lines naturally expressing PAFR to verify the localization of the receptor without overexpression. We used the A431 keratinocyte cell line, which naturally expresses caveolin-1, and the Ramos B cell line, which does not express proteins of the caveolin family, to help determine if caveolin1 is essential for PAFR localization in

low density membrane domains. As shown in Figure 1 C, PAFR is partially localized in lipid rafts in A431 cells, as only part of the PAFR pool colocalizes with caveolin-1 in fraction 5. To isolate lipid rafts from the Ramos B cell line, we used a method based on a previous study of B cell rafts (24). Surprisingly, it appeared that most, if not all of the PAFR pool was localized in lipid rafts in Ramos cells (Figure 1 D), as it colocalized with flotillin-1, a protein found almost exclusively in detergent insoluble membrane fractions of B cells (25,26), T cells (13,26,27) and endothelial cells (23). Therefore, it appeared that PAFR is preferentially localized in lipid rafts, in the presence or absence of caveolin.

PAFR and caveolin-1 are colocalized in living cells

Since our method for isolating low density membrane microdomains could not discriminate between caveolae and non-caveolar rafts, we therefore performed bioluminescence resonance energy transfer (BRET2) analysis to verify whether PAFR was located within 10-100 angstroms from caveolin-1. This system is based on energy transfer between 2 proteins, one being luciferase-coupled and the other being associated with GFP, in living cells. In the presence of a luciferase substrate (DeepBlueC) and O₂, when both proteins are distant from each other by less than 1 to 10 nm, an energy transfer from luciferase to GFP is obtained, which is represented by a positive BRET2 signal (generally over 0.06) given by the GFP/LUC bioluminescence ratio.

We thus subcloned caveolin-1, PAFR and CD4 into BRET2 vectors and the BRET2 signal was calculated after cotransfecting HEK 293 cells with different plasmid combinations (Figure

2). Figure 2A shows the BRET2 signal in HEK 293 cells transfected with 300ng luciferase-coupled caveolin-1 and increasing amounts of GFP-coupled PAFR, ranging from 200ng to 700ng. As illustrated, the BRET2 ratio started at 0.078 (positive signal) and went up to 0.130, suggesting a close proximity of PAFR and caveolin-1 in live resting cells. To verify the efficiency of this technique, we replaced the caveolin-1 construct with a luciferase-coupled CD4 cDNA as a negative control (Figure 2B). As expected, no positive BRET2 signal was observed with this latter combination, ratios varying from 0.041 to 0.046. To ensure the specificity of the interaction seen between luciferase-coupled caveolin-1 and GFP-coupled PAFR (Figure 2A), we reversed the combination, cotransfecting 400 ng of luciferase-PAFR with increasing amounts of GFP-caveolin-1, ranging from 100 ng to 600ng. A similar curve pattern was observed, BRET2 ratios varying from 0.071 (positive signal) to 0.090 (Figure 2C). These results strongly suggest the existence of a saturable and significant interaction between PAFR and caveolin-1 into the range of the 1 to 10 nm sensitivity of the BRET2 technique.

For comparison studies, we cotransfected different plasmid combinations (500ng of each plasmid) into HEK 293 cells and compared BRET2 ratios among combinations (Figure 2D). Luciferase-coupled CD4 and GFP-coupled PAFR combination gave a ratio of 0.046, which was significantly different from luciferase-coupled PAFR and GFP-coupled caveolin-1 combination (0.097, $p<0.01$) and LUC-coupled caveolin-1 and GFP-coupled PAFR combination (0.077 \pm x, $p<0.05$), using one way ANOVA with

Newman-Keuls multiple comparison test. It has been shown that PAFR can form oligomers at the membrane in resting cells (28). We thus used a combination of luciferase-coupled PAFR and GFP-coupled PAFR as a positive control for BRET2 comparison. The resulting BRET2 signal (0.121, $p<0.01$) was significantly different from that of luciferase-coupled CD4 and GFP-coupled PAFR combination and similar to BRET2 ratios obtained between caveolin-1 and PAFR. Caveolin-1 is also well known to form homodimers as well as oligomers (12,13,29-32), these complexes being the structural assembly units of caveolae. We therefore used a combination of luciferase-coupled caveolin-1 and GFP-coupled caveolin-1 constructs to assess the maximal BRET2 ratio possible since the diameter of caveolae (50-100 nm) is 5 to 10 times greater than the maximal distance for a positive BRET2 signal. As expected, the BRET2 ratio was markedly greater (0.433, $p<0.01$) than the negative control. Concentration-response curves using 300ng luciferase-coupled caveolin-1 and increasing amounts of GFP-coupled caveolin-1 ranging from 20ng to 400ng showed a similar pattern to those obtained in figure 2A and 2C, ratios varying from 0.057 to 0.521 (data not shown). Taken together, these results strongly suggest that at least part of the PAFR pool, in live resting cells, is located in close proximity to caveolin-1. When caveolin-1 is present, it could therefore play a role in positioning PAFR within lipid rafts, or caveolae.

PAFR coimmunoprecipitates with caveolin-1

BRET2 experiments showed PAFR and caveolin-1 to be closely located in the cell membrane of living cells. Because of the putative binding motif for caveolin-1 in the C-terminal portion of the PAFR,

we performed coimmunoprecipitation assays to see whether both proteins could be physically associated. HEK 293 cells were transfected with c-Myc epitope-tagged human PAFR or HA epitope-tagged human caveolin-1, or both, and immunoprecipitation of PAFR using anti-Myc monoclonal antibody was carried out. Western blot analysis using anti-PAFR antibody confirmed PAFR precipitation and anti-caveolin-1 antibody revealed a 24 kDa band when both constructs were cotransfected (Figure 3A). The same experiments were performed using monoclonal anti-HA antibody to immunoprecipitate caveolin-1 (Figure 3B). Purification of caveolin-1 was verified using anti-caveolin-1 antibody. Using anti-PAFR antibody we found again that PAFR associated with caveolin-1, when both proteins were coexpressed in cells. Similar results were obtained in COS-7 cells (data not shown). This strongly suggested that PAFR and caveolin-1 were physically associated and, thus, that a portion of the PAFR pool could be complexed with caveolin-1 and located in caveolar-rafts when both proteins were expressed at the same time.

Determination of the potential binding site for caveolin-1 on PAFR

In order to determine which part of PAFR is responsible for caveolin-1 binding, we used a GST pull-down assay to pull down HA-tagged caveolin-1 with GST-fused intracellular loops and C-tail of PAFR, as described under Experimental Procedures (Figure 3C). After separating proteins from the glutathione-agarose beads, we performed SDS-PAGE and Western blot analysis. Using anti-caveolin-1 antibody, we obtained a 24kDa band interacting with the GST- C-tail of PAFR. This result suggested that the

site of PAFR interaction with caveolin-1 was probably situated in the C-terminus part of the receptor, which corresponds to the position of the putative binding motif for caveolin-1(17) found in PAFR.

Integrity of caveolae/rafts is important for PAF-induced inositol phosphate production

As PAFR is localized in low density microdomains, we determined the efficiency of PAFR response, measured by inositol phosphate production, following disruption of rafts with methyl- β -cyclodextrin (CD), a cholesterol-sequestering agent. CHO cells stably expressing human PAFR were treated or not with 10mM CD for 30 minutes, washed, and stimulated with graded concentrations of PAF for 15 minutes to determine inositol phosphate production (Figure 4A). When cells were pretreated with CD, PAF-induced IP production was significantly reduced for PAF concentrations ranging from 1 to 1000nM and EC50 was markedly shifted to the right. Similar results were obtained when pretreating COS-7 cells transiently expressing PAFR with 2 μ g/mL filipin, an agent which selectively binds to cholesterol and induces structural disorders within cell membrane (data not shown). HEK 293 cells were also used to determine the effect of lipid raft disruption on PAF-induced IP production (Figure 4B). Cells were transiently transfected with human PAFR and results showed a marked decrease in IP production for PAF concentrations ranging from 1 to 1000nM, as well as a shift to the right for EC50. These results suggest that PAFR coupling to the G α_q protein, which is also located in lipid rafts, is strongly dependent on the integrity of lipid rafts/caveolae.

Cyclodextrin treatment does not change ligand affinity for PAFR

To ensure that cholesterol extraction using CD treatment at a concentration of 10nM for 30 min did not by itself affect the ability of PAFR to bind to its ligand, we performed radioligand binding experiments, as previously described (21), on HEK 293 cells (Figure 4C). Cells were transfected with human PAFR and, 48 hours post-transfection, half the cells were treated with CD, the other half with PBS. Cells were then washed and subjected to PAFR specific, saturable binding using the radiolabeled PAF antagonist WEB2086 (33,34), in the presence of increasing concentrations of PAF. No significant differences in binding curves were observed between CD-treated cells and control cells. This was also true for COS-7 cells and CHO cells (data not shown).

Effect of lipid raft disruption on PAF-induced intracellular calcium release

As functional PAFR coupling to Gαq was significantly reduced after lipid raft disruption by CD in transfected CHO and HEK 293 cell lines, we tested the impact of CD treatment on intracellular calcium release in two different cell lines naturally expressing PAFR. Figure 5A shows one representative curve of $[Ca^{2+}]_i$ flux (nM) after PAF stimulation (1×10^{-8} M) of A431 cells plated on coverslips for microscopy. Cells treated with 10mM CD were slower to start calcium release after stimulation than were control cells; however, this was not observed with 1mM CD treatment. Total calcium release (Figure 5B) from 10 mM CD-treated cells was significantly reduced compared to control cells ($51.22 \pm 8.9\%$ loss, $p < 0.05$). A similar tendency, although not statistically significant, was observed at 1mM CD ($17.28 \pm 6.3\%$ loss). These data suggested that PAFR coupling to

Gαq was dependent on low density microdomain integrity in caveolae-expressing cells, which corroborates the IP results obtained with transfected cells (Figure 4).

A concentration-response study of PAF-induced $[Ca^{2+}]_i$ release (nM) was performed on the Ramos cell line (Figure 5C) to determine the most effective concentration of PAF to induce calcium release. This showed 1×10^{-7} M PAF as being most potent and, thereafter, all other calcium experiments with Ramos cells were done using this concentration. Figure 5D shows one representative experiment of intracellular calcium release comparing control cells to cells treated with 1mM or 10 mM CD. Data indicate that 10mM CD almost completely abolished the response whereas 1mM CD was effective in reducing calcium release. Mean area under curve of 2 to 4 independent experiments (Figure 5E) indicates that CD treatment induced a $28 \pm 1\%$ ($p < 0.01$) decrease in $[Ca^{2+}]_i$ flux at 100nM, a $35 \pm 2\%$ ($p < 0.01$) decrease at 1mM and a $75.5 \pm 5.5\%$ ($p < 0.001$) decrease at 10mM, as compared with control cells, using one way ANOVA Newman-Keuls multiple comparison test. These data strongly suggest that PAFR coupling to Gαq is critically dependent on lipid raft integrity. Taken together with results on A431 cells, this may indicate that low density microdomains are essential for PAFR signal transduction through pathways involving Gαq independently of caveolin expression.

Differential effect of lipid raft disruption on MAPK signaling pathway

HEK 293 cells expressing human PAFR were stimulated with 1×10^{-8} M PAF for

different time periods and lysed. Extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) activation was assessed by Western blot using antibody against the phosphorylated form of ERK1/2 and loading was verified using antibody directed against ERK1 (Figure 6A). Data show a marked increase in ERK1/2 phosphorylation (6.5-fold) after 5 min stimulation as compared to controls with decreased phosphorylation thereafter. We thus used the 5 min time point for all further experiments.

HEK 293 cells, transfected with human PAFR cDNA, were left untreated or were incubated with 1×10^{-4} M PAF antagonist WEB2086. For lipid raft disruption, cells were treated with 10mM, 1mM or 0.1mM CD. Cells were then stimulated with PAF or vehicle (EtOH) and lysed for determination of ERK1/2 phosphorylation. A representative experiment is shown in Figure 6B. Data in the lower panel are expressed as fold induction of ERK1/2 phosphorylation as compared to vehicle and represent means of 4 independent experiments. PAF induced a 12.4-fold increase ($p < 0.01$) in ERK phosphorylation, which was reduced to 3.75 in the presence of WEB2086 and to 4.63 when cells were treated with 10mM CD ($p < 0.05$). ERK activation was reduced to 8.63 and 7.08 fold increase using 1 and 0.1mM CD, respectively. Similar experiments were performed on A431 cells (Figure 6C). Data showed a 6.77-fold induction ($p < 0.001$) of ERK activation when cells were stimulated with PAF, with a significant reduction to less than vehicle (0.51, $p < 0.001$) with WEB2086 and to a 2.17-fold increase ($p < 0.001$) with 10mM CD. We also examined ERK phosphorylation in the Ramos B cell line (Figure 6D). Data showed a 3.69-fold

increase ($p < 0.05$) in ERK activation when cells were stimulated with PAF, as compared to vehicle. This activation was antagonized with WEB2086 (0.94-fold, $p < 0.01$). Surprisingly, treatment with 10mM CD induced a significant (22.09-fold, $p < 0.05$) increase in ERK activation, as compared to untreated cells. The same tendency was observed with 1mM CD (4.85-fold), without being significantly different from controls. We therefore verified and confirmed that 10mM CD could not, by itself, induce a significant activation of ERK, in the absence of any PAF stimulation (data not shown). These results suggest a differential role for caveolae and non-caveolar lipid rafts in ERK1/2 phosphorylation induced by PAF stimulation.

Discussion

Caveolae and lipid rafts are two types of membrane microdomains that have been the object of extensive research in the past few years. Several proteins have been found to be associated almost exclusively within these domains, as reviewed in (12,13,35,36). Isolation of these domains can be done in many different ways (35) but there is no existing method that can specifically discriminate between the two types of microdomains. Using standard methods widely used for isolation of caveolae and lipid rafts, we demonstrated that PAFR is located within these domains in HEK 293, A431, CHO and Ramos cell lines. Since PAFR colocalizes with both caveolin-1 and flotillin-1, which are proteins found to be enriched in caveolae and lipid rafts, we could not clearly determine whether PAFR was located within caveolae or noncaveolar lipid rafts in cells expressing caveolae. We thus attempted to define whether PAFR could physically interact with a specific component of a subtype of

microdomains, namely caveolin-1.

Caveolin-1 is the major structural protein of caveolae. It is thus seen as a very good marker for caveolae. BRET2 is a sensitive method for determining whether two proteins are present in close proximity (within 1 to 10nm distance) from each other in living cells (37). This method was used for determining arrestin binding to GPCR (38) as well as for defining receptor dimerization (39-41). We therefore measured the association of PAFR and caveolin-1 in live resting cells using BRET2. Our data indicate that PAFR is effectively located within 1 to 10 nm distance from caveolin-1 in living cells. Additional results presented in this study suggest that PAFR is not only located close to caveolin-1 within living cells, but that it can physically bind to caveolin

1. This binding site is found in the C-terminal part of PAFR, which also contains a potential binding motif for caveolin-1, a motif shared by many caveolin-binding proteins, such as G proteins and eNOS. This motif was also found to be present in the AT1 receptor, but apparently was not important for AT1 location in caveolae. Whether this PAFR motif is responsible for PAFR association with caveolar rafts remains to be investigated.

Whereas a major proportion of the PAFR pool appears to be associated with caveolae in cells expressing caveolin-1, PAFR is also associated with lipid raft microdomains in cells lacking caveolin-1. This suggests that caveolin-1 may not be essential for PAFR localization in low density microdomains. Palmitoylation is a modification often found in proteins associated with lipid rafts, as reviewed in (42) and it seems likely that this

modification could play a role in lipid raft localization of proteins such as flotillins (43,44) and G proteins (45). Since PAFR possesses a putative palmitoylation site (conserved cysteine 317) in its C-terminus (46), it is conceivable to see the palmitate residue as a potential anchoring domain for PAFR within lipid rafts, in the absence of caveolin expression. This could also be true for caveolin-1 expressing cells since caveolin-1 binding motif has not yet been identified as entirely responsible for PAFR localization within caveolae.

Both caveolae and non caveolar lipid rafts are often seen as signaling platforms since these domains are enriched in many signaling proteins, as reviewed in (12,13,35,36). As mentioned above, slight differences exist in the signaling components found in these subtypes of microdomains. These differences are partly due to caveolin-1, which has been found to specifically interact with many signaling proteins (17,47). G proteins are among these signaling components enriched in microdomains (16,45,48-50). Several studies indicate that Gαq/11 (16,50) is mainly found in caveolae and rafts. Since PAFR has been shown to couple to Gαq/11, Gαi and Gαo subunits (4) and since PAFR is located within microdomains, we investigated the consequences of a disruption of these domains for PAFR coupling to Gαq/11. Inositol phosphate production, as well as intracellular calcium release, which presumably result mainly from Gαq/11 activation of PLCβ (51-53), are both affected by cholesterol extraction with methyl-β-cyclodextrin. This is observed both in cells expressing caveolin-1 and in cells lacking the latter, suggesting that PAFR coupling to Gαq/11 is critically dependent on the integrity of both types of microdomains.

PAFR activation of the MAPK family of proteins is well established. In a wide range of cell types, the MAPKs ERK1/2, p38 and JNKs are activated upon PAF stimulation (54-61). Extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) phosphorylation has been found to be independent of Ras (62), G proteins and receptor internalization (63). Since ERK has been found to physically associate with caveolin-1 (10), we proceeded to determine the importance of lipid rafts and caveolae in PAFR signalling through ERK1/2. Interestingly, PAF-induced ERK activation was affected in a different manner in cells expressing caveolin-1 and in cells lacking caveolae. In cells expressing caveolin-1, caveolae disruption markedly reduced the capacity for PAFR to phosphorylate ERK1/2. This seemed logical, since both PAFR and ERK were found within caveolae, in association with caveolin-1. In this case, caveolae disruption would limit PAFR accessibility to ERK proteins, thus reducing its activation. In contrast, in cells lacking caveolae, lipid raft disruption enhanced PAFR-dependent ERK phosphorylation. Receptor-mediated enhancement of ERK pathway following cyclodextrin treatment has also been reported in T lymphocytes (64-66), raising the hypothesis that normal levels of cholesterol may negatively regulate some downstream signaling events. Since PAFR is located within lipid rafts, but ERK is not necessarily enriched within these domains, we propose that, following lipid raft disruption, ERK would become more accessible to PAFR. In this particular case, the localization of PAFR within lipid rafts would be a limiting rather than a promoting factor for ERK activation.

In summary, we demonstrated that PAFR is preferentially located within membrane microdomains and that it physically interacts with caveolin-1 in living cells, potentially through a caveolin-1 binding sequence in its C-terminal tail. Moreover, PAFR can be located in lipid rafts in the absence of caveolin1, suggesting that this protein is not essential for PAFR location within low density microdomains. Results presented here also indicate that PAFR signaling through the Gαq protein is critically dependent on the integrity of lipid rafts and caveolae. Interestingly, in caveolin-1 expressing cells and in cells lacking caveolae, lipid raft disruption has opposite effects on PAFR capacity to signal through the ERK MAPK pathway. Taken together, these results indicate that PAFR is located in lipid rafts and/or caveolae and that this position is important for proper coupling to several downstream signaling elements.

Abbreviations

ATCC: American Type Culture Collection, BRET2 : Bioluminescence Resonance Energy Transfer, BSA : Bovine Serum Albumin, CD: methyl-β-cyclodextrin, D-MEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium , ERK : Extracellular signal-regulated kinase, FBS : Fetal Bovine Serum, HBSS : Hanks' Balanced Salt Solution, IL-8: interleukine-8, MAPK : Mitogen-activated protein kinase, MBS : 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid-buffered solution, MES : 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid, PAF : Platelet-activating factor, PAFR: Platelet-activating factor receptor, PBS: Phosphate-buffered saline, PCR: polymerase chain reaction

References

1. Benveniste, J., Henson, P. M., and Cochrane, C. G. (1972) *J Exp Med* **136**, 1356-1377
2. Honda, Z., Nakamura, M., Miki, I., Minami, M., Watanabe, T., Seyama, Y., Okado, H., Toh, H., Ito, K., Miyamoto, T., and et al. (1991) *Nature* **349**, 342-346
3. Ishii, S., Nagase, T., and Shimizu, T. (2002) *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 599-609
4. Honda, Z., Ishii, S., and Shimizu, T. (2002) *J Biochem (Tokyo)* **131**, 773-779
5. Parent, J. L., Gouill, C. L., Escher, E., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (1996) *J Biol Chem* **271**, 23298-23303
6. Lukashova, V., Asselin, C., Krolewski, J. J., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (2001) *J Biol Chem* **276**, 24113-24121
7. Chen, Z., Dupre, D. J., Le Gouill, C., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (2002) *J Biol Chem* **277**, 7356-7362
8. Dupre, D. J., Chen, Z., Le Gouill, C., Theriault, C., Parent, J. L., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (2003) *J Biol Chem* **278**, 48228-48235
9. Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., Stafforini, D. M., and McIntyre, T. M. (2000) *Annu Rev Biochem* **69**, 419-445
10. Engelman, J. A., Chu, C., Lin, A., Jo, H., Ikezu, T., Okamoto, T., Kohtz, D. S., and Lisanti, M. P. (1998) *FEBS Lett* **428**, 205-211
11. Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P. E., and Lisanti, M. P. (1998) *J Biol Chem* **273**, 5419-5422
12. Smart, E. J., Graf, G. A., McNiven, M. A., Sessa, W. C., Engelman, J. A., Scherer, P. E., Okamoto, T., and Lisanti, M. P. (1999) *Mol Cell Biol* **19**, 7289-7304
13. Galbiati, F., Razani, B., and Lisanti, M. P. (2001) *Cell* **106**, 403-411
14. Song, K. S., Li, S., Okamoto, T., Quilliam, L. A., Sargiacomo, M., and Lisanti, M. P. (1996) *J Biol Chem* **271**, 9690-9697
15. Oka, N., Yamamoto, M., Schwencke, C., Kawabe, J., Ebina, T., Ohno, S., Couet, J., Lisanti, M. P., and Ishikawa, Y. (1997) *J Biol Chem* **272**, 33416-33421
16. Oh, P., and Schnitzer, J. E. (2001) *Mol Biol Cell* **12**, 685-698
17. Couet, J., Li, S., Okamoto, T., Ikezu, T., and Lisanti, M. P. (1997) *J Biol Chem* **272**, 6525-6533
18. Cayouette, S., Lussier, M. P., Mathieu, E. L., Bousquet, S. M., and Boulay, G. (2004) *J Biol Chem* **279**, 7241-7246
19. Zhu, X., Jiang, M., Peyton, M., Boulay, G., Hurst, R., Stefani, E., and Birnbaumer, L. (1996) *Cell* **85**, 661-671
20. Gryniewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985) *J Biol Chem* **260**, 3440-3450
21. Le Gouill, C., Parent, J. L., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (1997) *J Biol Chem* **272**, 21289-21295
22. Smart, E. J., Ying, Y. S., Mineo, C., and Anderson, R. G. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10104-10108

23. Sprenger, R. R., Speijer, D., Back, J. W., De Koster, C. G., Pannekoek, H., and Horrevoets, A. J. (2004) *Electrophoresis* **25**, 156-172
24. Petrie, R. J., Schnetkamp, P. P., Patel, K. D., Awasthi-Kalia, M., and Deans, J. P. (2000) *J Immunol* **165**, 1220-1227
25. Solomon, S., Masilamani, M., Rajendran, L., Bastmeyer, M., Stuermer, C. A., and Illges, H. (2002) *Immunobiology* **205**, 108-119
26. Rajendran, L., Masilamani, M., Solomon, S., Tikkanen, R., Stuermer, C. A., Plattner, H., and Illges, H. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8241-8246
27. Slaughter, N., Laux, I., Tu, X., Whitelegge, J., Zhu, X., Effros, R., Bickel, P., and Nel, A. (2003) *Clin Immunol* **108**, 138-151
28. Perron, A., Chen, Z. G., Gingras, D., Dupre, D. J., Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M. (2003) *J Biol Chem* **278**, 27956-27965
29. Sargiacomo, M., Scherer, P. E., Tang, Z., Kubler, E., Song, K. S., Sanders, M. C., and Lisanti, M. P. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9407-9411
30. Monier, S., Parton, R. G., Vogel, F., Behlke, J., Henske, A., and Kurzchalia, T. V. (1995) *Mol Biol Cell* **6**, 911-927
31. Lisanti, M. P., Tang, Z. L., and Sargiacomo, M. (1993) *J Cell Biol* **123**, 595-604
32. Schlegel, A., and Lisanti, M. P. (2000) *J Biol Chem* **275**, 21605-21617
33. Ukena, D., Dent, G., Birke, F. W., Robaut, C., Sybrecht, G. W., and Barnes, P. J. (1988) *FEBS Lett* **228**, 285-289
34. Dent, G., Ukena, D., Sybrecht, G. W., and Barnes, P. J. (1989) *Eur J Pharmacol* **169**, 313-316
35. Anderson, R. G. (1998) *Annu Rev Biochem* **67**, 199-225
36. Pike, L. J. (2003) *J Lipid Res* **44**, 655-667
37. Pflieger, K. D., and Eidne, K. A. (2003) *Pituitary* **6**, 141-151
38. Heding, A. (2004) *Expert Rev Mol Diagn* **4**, 403-411
39. Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilaiet, S., Chelsky, D., Dennis, M., and Bouvier, M. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3684-3689
40. Hanyaloglu, A. C., Seeber, R. M., Kohout, T. A., Lefkowitz, R. J., and Eidne, K. A. (2002) *J Biol Chem* **277**, 50422-50430
41. Pfeiffer, M., Kirscht, S., Stumm, R., Koch, T., Wu, D., Laugsch, M., Schroder, H., Holtt, V., and Schulz, S. (2003) *J Biol Chem* **278**, 51630-51637
42. Resh, M. D. (2004) *Subcell Biochem* **37**, 217-232
43. Neumann-Giesen, C., Falkenbach, B., Beicht, P., Claasen, S., Luers, G., Stuermer, C. A., Herzog, V., and Tikkanen, R. (2004) *Biochem J* **378**, 509-518
44. Morrow, I. C., Rea, S., Martin, S., Prior, I. A., Prohaska, R., Hancock, J. F., James, D. E., and Parton, R. G. (2002) *J Biol Chem* **277**, 48834-48841
45. Moffett, S., Brown, D. A., and Linder, M. E. (2000) *J Biol Chem* **275**, 2191-2198
46. Izumi, T., and Shimizu, T. (1995) *Biochim Biophys Acta* **1259**, 317-333
47. Krajewska, W. M., and Maslowska, I. (2004) *Cell Mol Biol Lett* **9**, 195-220
48. Li, S., Okamoto, T., Chun, M., Sargiacomo, M., Casanova, J. E., Hansen, S. H., Nishimoto, I., and Lisanti, M. P. (1995) *J Biol Chem* **270**, 15693-15701
49. Svoboda, P., Teisinger, J., Novotny, J., Bourova, L., Drmot, T., Hejnova, L., Moravcova, Z., Lisy, V., Rudajev, V., Stohr, J., Vokurkova, A., Svandova, I., and Durchankova, D. (2004) *Physiol Res* **53 Suppl 1**, S141-152
50. Matousek, P., Durchankova, D., Svandova, I., Novotny, J., and Svoboda, P.

- (2005) *Biochem Biophys Res Commun* **328**, 526-532
51. Carlson, S. A., Chatterjee, T. K., and Fisher, R. A. (1996) *J Biol Chem* **271**, 23146-23153
 52. Dupre, D. J., Le Gouill, C., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (2001) *J Pharmacol Exp Ther* **299**, 358-365
 53. Amatruda, T. T., 3rd, Gerard, N. P., Gerard, C., and Simon, M. I. (1993) *J Biol Chem* **268**, 10139-10144
 54. Chen, L. W., Lin, M. W., and Hsu, C. M. (2005) *J Biomed Sci* **12**, 311-319
 55. Wang, H., and Chakrabarty, S. (2003) *Oncogene* **22**, 2186-2191
 56. Cuschieri, J., Gourlay, D., Bulger, E., Garcia, I., Jelacic, S., and Maier, R. V. (2002) *Surgery* **132**, 157-166
 57. Marques, S. A., Dy, L. C., Southall, M. D., Yi, Q., Smietana, E., Kapur, R., Marques, M., Travers, J. B., and Spandau, D. F. (2002) *J Pharmacol Exp Ther* **300**, 1026-1035
 58. Maruoka, S., Hashimoto, S., Gon, Y., Takeshita, I., and Horie, T. (2000) *Am J Respir Crit Care Med* **161**, 922-929
 59. Miike, S., Kurasawa, K., Saito, Y., and Iwamoto, I. (2000) *J Leukoc Biol* **67**, 117-126
 60. Bazan, H. E., and Varner, L. (1997) *Curr Eye Res* **16**, 372-379
 61. Franklin, R. A., Tordai, A., Mazer, B., Terada, N., Lucas, J., and Gelfand, E. W. (1995) *Biochem Biophys Res Commun* **209**, 1111-1118
 62. Honda, Z., Takano, T., Gotoh, Y., Nishida, E., Ito, K., and Shimizu, T. (1994) *J Biol Chem* **269**, 2307-2315
 63. Chen, Z., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (2003) *Cell Signal* **15**, 843-850
 64. Zubiaur, M., Fernandez, O., Ferrero, E., Salmeron, J., Malissen, B., Malavasi, F., and Sancho, J. (2002) in *J Biol Chem* Vol. 277, pp. 13-22
 65. Kabouridis, P. S., Janzen, J., Magee, A. L., and Ley, S. C. (2000) in *Eur J Immunol* Vol. 30, pp. 954-963
 66. Munoz, P., Navarro, M. D., Pavon, E. J., Salmeron, J., Malavasi, F., Sancho, J., and Zubiaur, M. (2003) in *J Biol Chem* Vol. 278, pp. 50791-50802

Figure 1

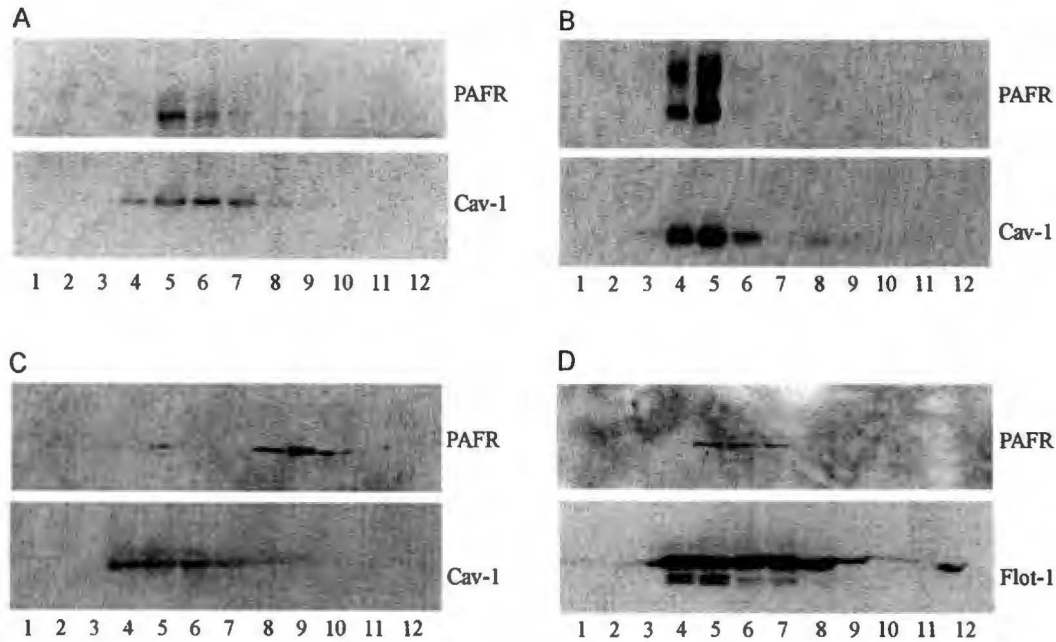


FIG. 1. Lipid rafts/caveolae isolation to assess the localization of the PAFR in CHO, HEK 293, A431 and Ramos cell lines. Lipid rafts were isolated using a discontinuous sucrose gradient. **A**, Data show 12 fractions collected from the top of the ultracentrifuge tube of lipid raft isolation from CHO and stably expressing PAFR. Proteins from equal volume of each fraction were precipitated and loaded on SDS-PAGE. Membranes were blotted with anti-PAFR antibody and caveolin-1 antibody. Data also show same experiment with **B**, HEK 293 cells transiently expressing c-Myc-tagged PAFR and **C**, A431 cell line. Blots are one representative of 2 to 6 independent experiments. **D**, Data show a representative blot of 2 independent lipid raft isolations performed on 300x10⁶ Ramos cells using Triton X-100 in Hepes as buffer. Proteins from each fraction were precipitated, loaded on SDS-PAGE and transferred into nitrocellulose membranes. Anti-PAFR and anti-flotillin-1 antibodies were used to determine PAFR localization within lipid rafts.

Figure 2

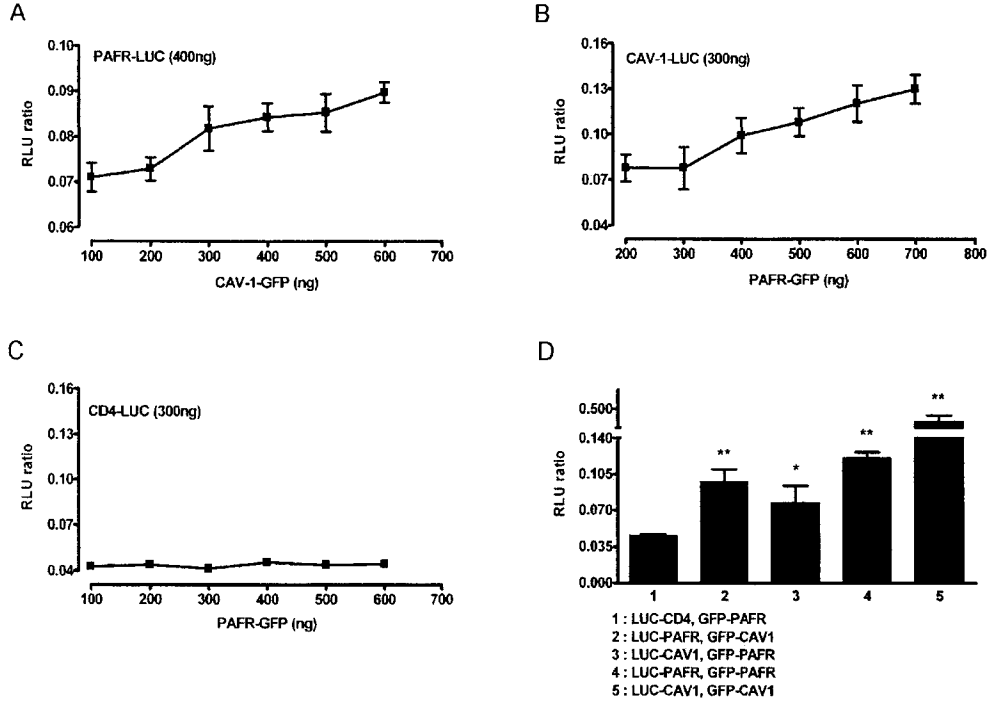


FIG. 2. BRET2 assay for interaction between caveolin-1 and PAFR on HEK 293 cells. **A**, 300ng of luciferase-coupled caveolin-1 (LUC-CAV1) or **B**, 300 ng of luciferase-coupled CD4 cDNA (LUC-CD4) were cotransfected in HEK 293 cells with increasing amounts of GFP-PAFR cDNAs and BRET2 signal was analysed. **C**, same experiment was done utilizing 400ng of LUC-PAFR with increasing amounts of GFP-CAV1. Graph represents means of 2 to 4 independent experiments, each done in triplicate. **D**, Cells were transfected with 500 ng of each construct and BRET2 signal was analysed. Graph represents means of 3 to 5 independent experiments, each done in triplicate (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Figure 3

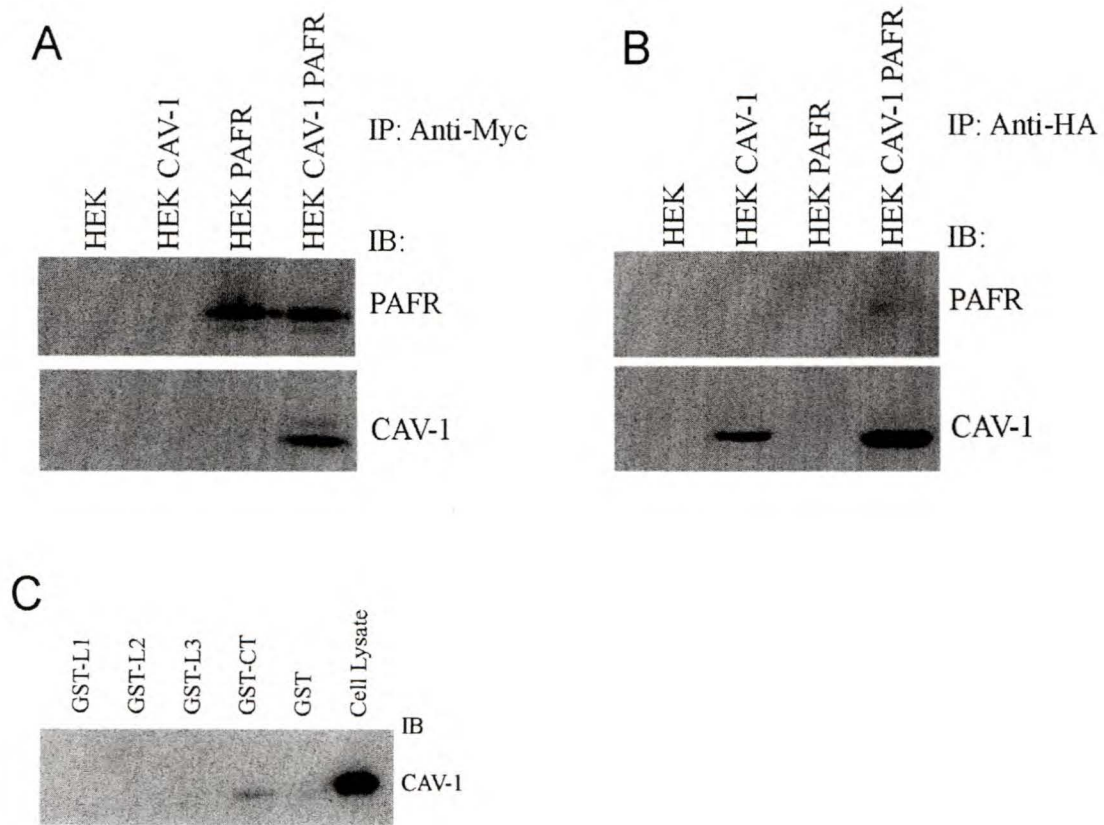


FIG. 3. Coimmunoprecipitation of PAFR and caveolin-1. HEK 293 cells were transiently transfected with either myc-PAFR, caveolin1-HA, or both. 48 hours post-transfection, immunoprecipitation was carried out with **A**, anti-Myc antibody or **B**, anti-HA antibody. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes and revealed with anti-PAFR and anti-caveolin-1 antibodies. Blot is representative of two independent experiments. **C**, GST pull-down of GST-tagged PAFR intracellular loops (GST-L1 to GST-L3) and C-tail followed by Western blot using anti-caveolin-1 antibody. Figure is representative of at least 2 different experiments.

Figure 4

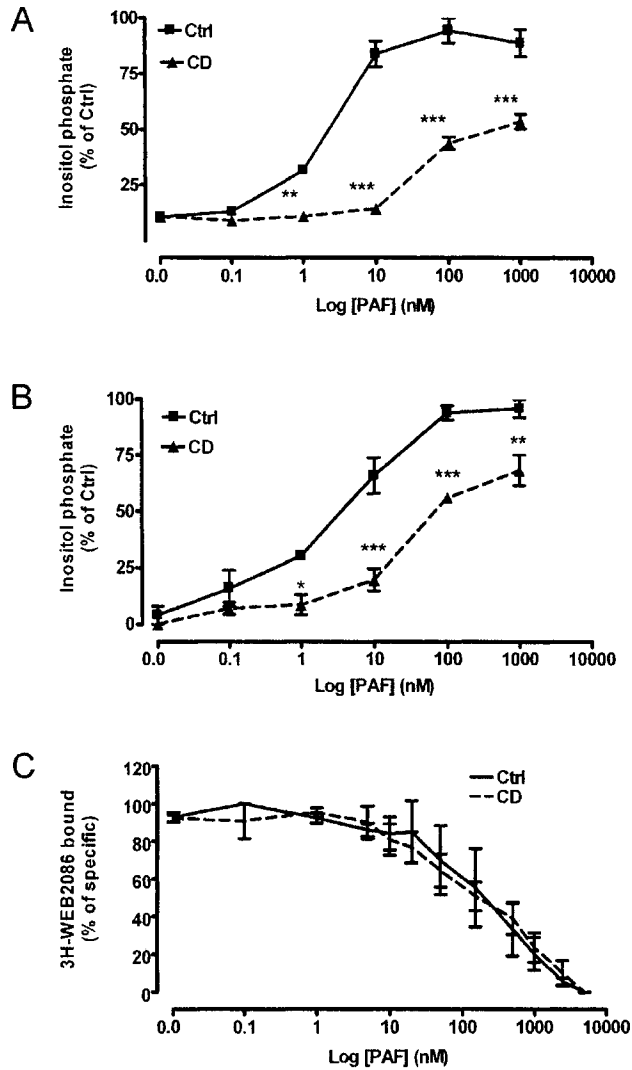


FIG. 4. Inositol phosphate determination and binding analysis after lipid raft disruption. To disrupt lipid rafts, cells were treated with 10mM methyl- β -cyclodextrin (CD) for 30 min at 37°. Concentration-response of PAF-induced inositol phosphate formation was determined on **A**, CHO cells stably expressing PAFR and **B**, HEK 293 cells transiently expressing PAFR. Curves are representative of 3 independent experiments, each done in triplicates (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). **C**, ^3H -WEB2086 binding experiment was performed on HEK 293 cells transiently expressing PAFR with or without CD treatment. Graph represents means of 3 independent experiments, each done in triplicate.

Figure 5

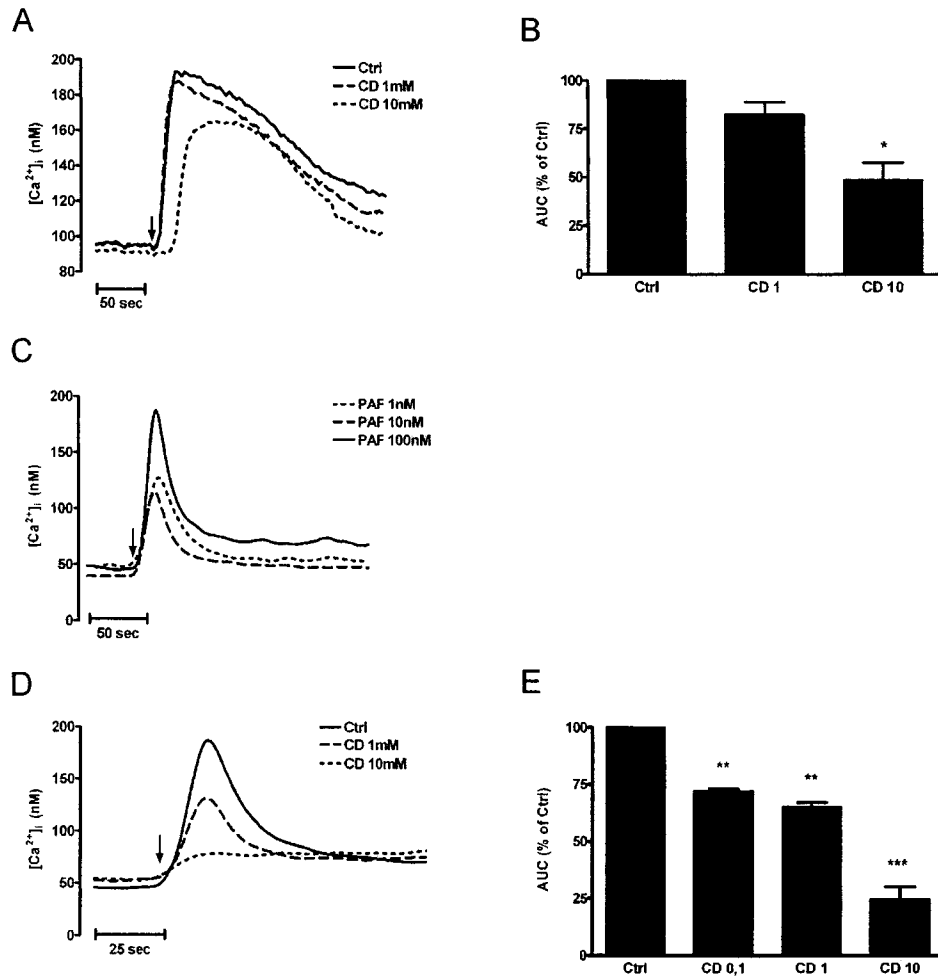


FIG. 5. Calcium mobilization on A341 and Ramos cells after lipid raft disruption. **A**, PAF-induced (1×10^{-8} M) intracellular calcium release was determined on A431 cells after treatment with 1mM or 10mM of cyclodextrin to disrupt lipid rafts/caveolae. Graph is representative of 3 independent experiments, each done on 3 coverslips of about 50-60 cells per condition. **B**, Area under curve of each condition in (A) was calculated and data are means of 3 independent experiments (* $p < 0.05$). **C**, Concentration-response of PAF-induced calcium mobilization was determined on 5×10^6 Ramos cells. **D**, PAF-induced (1×10^{-7} M) calcium mobilization was determined after treating Ramos cells with 1mM or 10mM cyclodextrin. Graph is representative of 2 to 4 independent experiments. **E**, Area under curve of cells treated with 0.1, 1 and 10mM cyclodextrin was calculated and data are means of 2 to 4 independent experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Figure 6

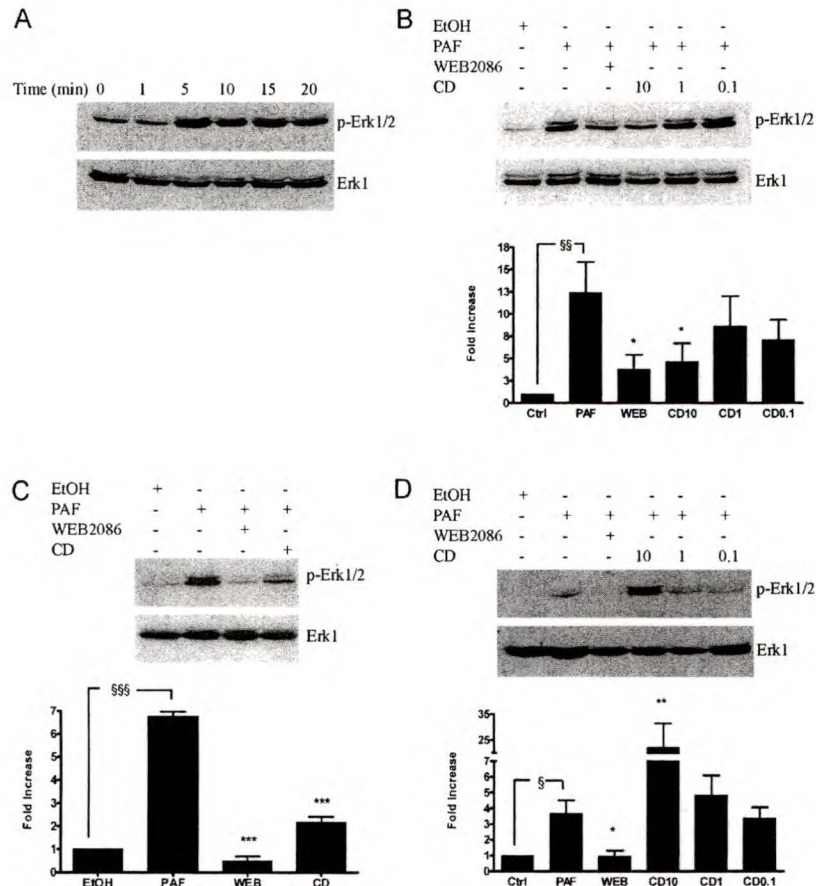


FIG. 6. ERK1/2 phosphorylation on HEK 293, A431 and Ramos cells after lipid raft disruption. **A**, kinetics of PAF-induced (1×10^{-8} M) ERK1/2 phosphorylation in HEK 293 cells transiently expressing PAFR. Membranes were probed with anti-p-Erk1/2 antibody, stripped, and blotted with anti-ERK1 antibody. **B**, HEK cells expressing PAFR were pretreated with 10, 1 or 0.1mM cyclodextrin or with WEB2086 (1×10^{-4} M) and stimulated with 1×10^{-8} M PAF for 5 minutes. Blot is representative of 4 independent experiments. Lower panel is a representation fold increase of mean optical density of 4 experiments (§§ $p < 0.01$, * $p < 0.05$). **C**, A431 cells were pretreated with 10mM CD or with WEB2086 (1×10^{-4} M) and stimulated with 1×10^{-8} M PAF for 5 minutes. Upper panel shows a representative blot from 2 independent experiments and lower panel is a representation of fold increase of mean optical density of 2 independent experiments (§§§ $p < 0.001$, *** $p < 0.001$). **D**, 1×10^6 Ramos cells were pretreated with 10, 1, 0.1mM CD or WEB2086 and stimulated with 1×10^{-8} M PAF for 5 min. Upper panel is a blot representative of 6 independent experiments and lower panel is a representation of fold increase of mean optical density of these experiments (§ $p < 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Discussion

Microdomaines lipidiques et PAFR

Les microdomaines lipidiques ont été l'objet de nombreuses recherches depuis les dernières années et plusieurs chercheurs se sont attardés à leur fonction de plate-forme de signalisation. En effet, le nombre de protéines retrouvées associées avec les radeaux lipidiques et les caveolae est sans cesse grandissant. Les caveolae et les radeaux lipidiques sont deux types de microdomaines membranaires distinguables l'un de l'autre par, entre autre, leur contenu en protéines. En effet, la présence de protéines de la famille des cavéolines modifie grandement la composition protéique des caveolae, ceci étant en partie dû à la capacité de la cavéoline à lier directement plusieurs molécules via son domaine d'échafaudage. Parmi ces protéines, on retrouve plusieurs molécules de signalisation, mais aussi plusieurs récepteurs, dont des GPCRs. Puisque le PAFR possède, en portion C-terminale, un motif potentiel de liaison à la cavéoline-1 et que les caveolae représentent des plate-formes de signalisation prédéfinies pour plusieurs récepteurs, l'objectif principal de ces travaux de recherche était de tenter de déterminer si le PAFR pouvait être localisé dans les caveolae et ou les radeaux lipidiques.

Premièrement, en utilisant un système de surexpression du PAFR et de la cavéoline-1 dans des cellules de type CHO et HEK 293, nous avons démontré que le PAFR colocalise avec la cavéoline-1 dans les microdomaines lipidiques de ces cellules. De plus, chez des cellules de type kératinocytes, qui expriment de façon endogène à la fois le PAFR et la cavéoline-1, nous avons montré qu'une partie du PAFR de ces cellules colocalise avec la cavéoline-1. Malheureusement, comme notre technique d'isolement de

microdomaines ne permet pas de dissocier les radeaux lipidiques de type classique des caveolae, il ne nous était pas possible, à ce stade, de déterminer si le PAFR était associé avec les caveolae, les radeaux lipidiques, ou les deux à la fois. Pour tenter d'éclaircir ce point, nous disposions de deux solutions principales. La première solution était d'explorer la localisation du PAFR chez des cellules n'exprimant pas de caveolae à leur surface, ce qui, en fonction du résultat, pourrait exclure ou non l'association du PAFR au sein des radeaux lipidiques de type classique. Deuxièmement, nous pouvions tenter de démontrer s'il existe une association physique entre le PAFR et la cavéoline-1, ce qui, en cas de résultat positif, nous permettrait de prouver qu'au moins une fraction du PAFR exprimé soit associée avec les caveolae.

La localisation du PAFR au sein des radeaux lipidiques de type classique, c'est-à-dire en l'absence de caveolae, a donc été investiguée, afin de déterminer si la présence de cavéoline est essentielle à l'association du PAFR avec les micros domaines lipidiques. Malheureusement, parmi les cellules exprimant de façon endogène le PAFR, plusieurs expriment aussi la cavéoline. En effet, la présence de cavéoline au sein des cellules immunitaires est encore controversée (Harris, Werling et al. 2002). On pourrait retrouver de la cavéoline chez les cellules myéloïdes, et ce, en fonction de l'activation et du stade de maturation des cellules alors qu'aucune expression de cette protéine n'a encore été répertorié pour les cellules lymphoïdes humaines. Un élément en faveur de l'absence de cavéoline chez les cellules lymphoïdes est le fait de l'apparition de caveolae et le recrutement de nouvelles molécules à la surface cellulaire chez ces cellules lorsque l'on force l'expression de la cavéoline (Vallejo and Hardin 2005). Pour ces différentes raisons, une lignée cellulaire de type B a été utilisée pour déterminer le positionnement

du PAFR chez des cellules ne possédant pas de caveolae, les cellules de type monocytes, macrophages et neutrophiles ayant été écartées de l'étude en fonction de l'ambiguïté existante quant à l'expression de la cavéoline. En utilisant une souche de cellules B (Ramos), nous avons montré que le PAFR est localisé préférentiellement au sein des radeaux lipidiques de type classique. Ceci implique donc que le PAFR puisse être localisé à la fois dans les radeaux lipidiques classiques et dans les caveolae. En somme, nous ne pouvions pas éliminer l'un ou l'autre des sous-types de micros domaines. La cavéoline étant absente des cellules B, il existerait donc quelque chose d'autre qui puisse ancrer le PAFR aux radeaux lipidiques. Il a été démontré que des modifications post-traductionnelles telles que la palmitoylation, peuvent jouer un rôle dans l'association de différentes molécules avec les radeaux lipidiques (Moffett, Brown et al. 2000; Morrow, Rea et al. 2002; Neumann-Giesen, Falkenbach et al. 2004; Resh 2004). Le PAFR possédant un site potentiel de palmitoylation en la cystéine conservée 317 (Izumi and Shimizu 1995), il n'est pas exclu que ce soit l'une des raisons qui puisse expliquer la présence du récepteur au sein des radeaux lipidiques. Cependant, cette hypothèse n'a pas été vérifiée lors des travaux de recherche présentés dans ce mémoire, mais représente une excellente perspective future pour cette étude.

Le PAFR ayant été trouvé en association avec les radeaux lipidiques de type classique, nous avons tenté de déterminer s'il pouvait y avoir une association physique entre la cavéoline-1 et le PAFR afin de vérifier si le PAFR pouvait aussi être localisé dans les caveolae. Pour ce faire, nous avons utilisé le BRET2 (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) comme technique d'analyse. En effet, tel que mentionné dans l'article présenté, le BRET2 permet de distinguer une interaction entre deux

protéines séparées par moins de 10 nanomètres. Les résultats obtenus nous permettent de d'affirmer que seulement 1 à 10 nanomètres séparent le PAFR de la cavéoline-1 au sein de cellules vivantes au repos. À notre connaissance, les travaux de recherche présentés ici démontrent pour la première fois l'association d'une protéine avec les caveolae chez des cellules vivantes, donc en évitant la lyse cellulaire. En effet, c'est la première fois que la technologie de BRET2 intervient pour aider à discriminer entre radeaux lipidique classiques et caveolae. L'interaction retrouvée ici entre la cavéoline-1 et le PAFR, par BRET2, est une interaction spécifique en ce sens qu'elle n'est pas retrouvée avec tous les récepteurs. En effet, aucune association de cavéoline-1 avec les récepteurs des leukotriènes C4 et D4, soient les récepteurs cysLT1 et cysLT2 n'a été retrouvée lors d'essais préliminaires effectués en laboratoire, mais non publiés. C'est donc dire que l'interaction retrouvée entre la cavéoline-1 et le PAFR par technologie de BRET2 est spécifique à ce récepteur et que le BRET2 représente une technologie intéressant dans l'étude future des caveolae.

Pour plus de précision, nous avons aussi testé l'interaction entre la cavéoline-1 et le PAFR par technique de coimmunoprécipitation. Les résultats obtenus, encore une fois, permettent d'affirmer qu'il existe une association physique entre le PAFR et la cavéoline-1, ce qui va dans le même sens que les résultats obtenus par BRET 2. Ceci suggère donc fortement qu'au moins une partie de tous les récepteurs du PAF exprimés à la surface cellulaire sont localisés dans les caveolae, puisque le PAFR peut s'associer directement à la cavéoline-1, la protéine structurale majeure de ce sous-type de micro domaine lipidique. De plus, par technique d'immunoprécipitation à l'aide d'une étiquette GST, il nous a été possible de déterminer que l'association entre les deux protéines se ferait via la

queue C-terminal du PAFR. Ce dernier résultat n'est pas surprenant, puisque le motif potentiel de liaison à la cavéoline-1 que possède le PAFR est justement situé dans cette partie de la protéine. Cependant, il est pour le moment difficile d'affirmer que l'interaction a lieu au niveau de ce motif de liaison potentiel. Une perspective intéressante pour la poursuite du projet serait entre autre de muter quelques acides aminés de ce motif, sur le PAFR et d'étudier si l'interaction avec la cavéoline est conservée. En effet, la prédominance d'acides aminés aromatiques conservés de ce motif laisse penser qu'ils sont peut-être importants pour la liaison de la cavéoline avec d'autres protéines. En remplaçant ces acides aminés, un à la fois, ou tous ensembles, on pourrait avoir une meilleure idée de l'importance de ce motif dans la liaison du PAFR à la cavéoline-1.

Éléments de signalisation intracellulaire

Une fois l'association du PAFR aux radeaux lipidiques et aux caveolae établie, nous nous sommes penchés sur l'implication de cette association sur le fonctionnement du récepteur. Les microdomaines lipidiques étant reconnus pour leur implication dans la signalisation cellulaire, nous avons recherché quelques protéines localisées préférentiellement dans ces domaines et utilisées par le PAFR. L'une des voies de signalisation les mieux connues pour le PAFR est sans doute celle impliquant la sous-unité α_q des protéines G ($G\alpha_q/11$). En effet, cette voie mène généralement à l'activation de la phospholipase C (PLC), ce qui se manifeste par une production d'inositol phosphates, de diacylglycérol (DAG), ainsi que par la mobilisation de calcium (voir la figure 5). De plus, tel que mentionné dans précédemment, $G\alpha_q/11$ est lié directement à la cavéoline-1 et est donc situé de façon préférentielle dans les caveolae en présence de la protéine (Oh and Schnitzer 2001). Toutefois, en absence de cavéoline, $G\alpha_q/11$ s'associe avec les radeaux lipidiques. Pour cette raison, nous avons tenté de déterminer l'importance de la localisation du PAFR et de $G\alpha_q/11$ dans les caveolae et les radeaux lipidiques. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthyl- β -cyclodextrine (CD), un polysaccharide cyclique imperméable à la membrane plasmique et ayant un cœur hydrophobe qui extrait rapidement et sélectivement le cholestérol de la membrane (Awasthi-Kalia, Schnetkamp et al. 2001). Les micros domaines lipidiques étant enrichis en cholestérol, en présence de CD, ils sont déstabilisés, ce qui permet de vérifier le rôle de ces domaines dans, par exemple, la signalisation cellulaire. Tel que mentionné dans l'article présenté de ce mémoire, l'altération des radeaux lipidiques et des caveolae par la CD provoque une diminution de près de 50% de la production d'inositol phosphates

induite par le PAF. Ces résultats indiquent donc que l'intégrité des microdomaines membranaires est importante pour la signalisation du PAFR par $G\alpha_q/11$. Cependant, encore ici, il était impossible de distinguer si l'effet observé venait de l'altération des caveolae, des radeaux lipidiques, ou des deux à la fois. De plus, la diminution de la production d'inositol phosphate observée pouvait tout aussi bien être due à une diminution de l'affinité du PAF pour son récepteur, ce dernier effet pouvant être imputable au seul traitement par la CD.

Afin d'éclaircir les dernières questions, nous avons tout d'abord tenté de vérifier si un seul traitement à la CD pouvait altérer l'affinité du PAF pour le PAFR. Les résultats obtenus suite à des tests de liaison d'antagoniste de PAF marqué au tritium et déplacé par du PAF non marqué, nous permettent de croire que l'extraction du cholestérol membranaire par la CD n'a pas d'effet détectable sur l'affinité du PAF pour son récepteur. Les résultats de signalisation cellulaire obtenus suite à un traitement des cellules à la CD ne sont donc pas attribuables à un changement d'affinité du PAF pour le PAFR.

Dans le but de tenter de déterminer lequel des sous-types de microdomaines étudiés était important pour la signalisation du PAFR via $G\alpha_q/11$, des essais de mobilisation calcique ont été effectués. Tel que mentionnée ci-haut, la relâche de calcium intracellulaire ainsi que l'entrée de calcium depuis l'extérieur de la cellule sont deux phénomènes reliés induits par le PAF suite à l'activation de $G\alpha_q/11$. De plus, comme mentionné dans la section d'introduction du présent mémoire, plusieurs des éléments de régulation du calcium ont été retrouvés associés aux caveolae et aux radeaux lipidiques. Pour différencier caveolae et radeaux lipidiques, nous avons utilisé des kératinocytes

(A431) exprimant la cavéoline-1 et des cellules Ramos (lignée de cellules B) n'exprimant pas de caveoline à leur surface. Les résultats de calcium obtenus permettent de supposer qu'encore ici, les deux sous-types de microdomaines sont importants pour la signalisation via $G\alpha_q/11$ induite par le PAF. Ceci se traduit par une forte diminution de la mobilisation calcique chez les Ramos suite à un traitement à la CD et à une bonne diminution de la relâche intracellulaire de calcium induite par le PAF chez les kératinocytes, toujours suite à l'altération des caveole. Naturellement, le fait que la cyclodextrine puisse avoir un effet sur la viabilité des cellules, et donc sur leur capacité signalétique restait à prouver. Quoique non mentionné dans l'article, un essai de viabilité des cellules B, a été effectué suite à un court traitement des cellules à la CD. Les résultats obtenus montrent que, mêmes plusieurs jours après le traitement, le taux de mortalité des cellules B est le même chez les cellules traitées à la CD que pour les cellules non traitées, éliminant ainsi la possibilité de l'altération de la viabilité cellulaire par la CD. Mis ensembles, ces résultats viennent donc compléter ceux précédemment obtenus avec la production d'inositol phosphates et permettent de supposer que l'intégrité des deux sous-types de microdomaines étudiés est importante pour la signalisation du PAFR, du moins via $G\alpha_q/11$.

Deux autres molécules clés de la cascade signalétique du PAFR sont les MAPK ERK1 et ERK2. En effet, quoique les éléments en amont de ces protéines soient mal connus, la phosphorylation de ces deux composantes est relativement bien établie en ce qui concerne le PAFR. Étant donné l'association de ces MAPK aux caveolae (Lisanti, Scherer et al. 1994; Wu, Butz et al. 1997), et plus particulièrement, l'association de la cavéoline-1 avec ces MAPK (Engelman, Chu et al. 1998), nous avons tenté de déterminer l'implication des caveolae est des radeaux lipidiques sur la signalisation du PAFR via ces

MAPK en comparant, encore ici, les cellules de type kératinocyte exprimant la cavéoline aux cellules B n'exprimant pas de caveolae à leur surface. Les résultats obtenus sont plutôt surprenants, en ce sens que chez les cellules de type kératinocytes, l'altération des caveolae entraîne une diminution de l'activation de ERK1/2 induite par le PAF, alors que chez les cellules B, c'est plutôt l'effet inverse qui est observé. En effet, l'altération des radeaux lipidiques entraîne, chez ces cellules, une augmentation significative de la phosphorylation des MAPK ERK1/2. L'hypothèse suivante peut alors être formulée : la cavéoline-1 liant directement à la fois les MAPK et le PAFR, ces molécules se retrouvent à proximité les unes des autres au sein des caveolae, ce qui peut faciliter l'interaction entre le PAFR et les kinases. Ainsi, l'altération des microdomaines de type caveolae par la CD viendrait altérer cette proximité et donc diminuer la capacité du PAFR à signaler via ces molécules. Par contre, aucune étude ne fait mention d'une localisation préférentielle des MAPK au sein des radeaux lipidiques de type classique. Il est donc possible de supposer que l'altération des radeaux lipidiques facilite l'accès du PAFR aux MAPK, ce qui expliquerait l'augmentation de la phosphorylation observée lors de traitement des cellules avec la CD. Il serait tout aussi possible que ce soit plutôt la ou les molécules en amont des MAPK qui influencent la réponse de ces dernières suite à l'altération des microdomaines lipidiques. Malheureusement, ces molécules sont encore mal définies pour le moment. Naturellement, il s'agit ici de pures hypothèses qui se devraient d'être vérifiées par quelques études plus poussées sur le présent sujet, mais ces hypothèses représentent encore ici une perspective intéressante dans la poursuite de ce projet.

Pour terminer, il est bien connu que l'activation d'un promoteur génique nécessite plus d'une molécule de signalisation et peut parfois même être le fruit de l'activation de plusieurs voies de signalisation complémentaires. Nous avons donc tenté de vérifier l'importance de l'intégrité des microdomaines lipidiques sur une telle activation. Il est aussi bien connu que le PAFR peut induire, suite à une stimulation au PAF, la production de différentes cytokines, dont l'interleukine-8 (IL-8), une chimiokine importante pour le recrutement de cellules inflammatoires (voir la section introduction). Les résultats obtenus lors de ces essais (non montrés dans l'article) nous permettent d'affirmer que les radeaux lipidiques, les caveolae, ou les deux, sont, du moins en partie, importants pour l'activation du promoteur de l'IL-8. Ceci permet donc de supposer que les microdomaines lipidiques peuvent non seulement influencer une molécule de signalisation en particulier, mais ont aussi la capacité d'influencer toute une cascade signalétique complexe menant à l'activation d'un gène précis. Plus particulièrement, dans le cas du PAFR, les microdomaines membranaires peuvent influencer la production d'IL-8.

Conclusion

Les travaux de recherche présentés ici visaient premièrement à déterminer si le PAFR pouvait être localisé de façon préférentielle au niveau de microdomaines de la membrane plasmique connus pour former des plate-formes de signalisation prédéfinies pour plusieurs récepteurs, dont des GPCRs. Tel que mentionné dans l'article présenté dans ce mémoire, le PAFR serait associé en totalité ou en partie avec les caveolae ou les radeaux lipidiques chez des cellules de types HEK 293, CHO, COS-7 et A431 et serait potentiellement associé en majeure partie avec les radeaux lipidiques chez des cellules de type Ramos. Étant donné l'association physique entre la cavéoline-1, protéine constitutive des caveolae, et le PAFR, association démontrée par technologie de BRET2 et par coimmunoprécipitation, il est possible de suggérer que le PAFR soit associé en partie avec les caveolae en tant que sous-population de radeaux lipidiques, et ce, chez des cellules exprimant la cavéoline-1. De plus, l'association physique entre le PAFR et la cavéoline-1 se ferait probablement via le motif de liaison à la cavéoline-1 retrouvé en C-terminal du PAFR, tel que suggéré par les résultats d'immunoprécipitation de la cavéoline-1 avec les diverses portions du PAFR. Dans le cas où les cellules n'expriment pas de caveolae à leur surface, le PAFR semble tout de même localisé dans les radeaux lipidiques, suggérant une certaine dépendance du PAFR pour l'environnement lipidique des microdomaines.

En second lieu, la capacité du PAFR à activer diverses voies de signalisation a été examinée suite à l'altération des microdomaines lipidiques par un traitement à la méthyl- β -cyclodextrine. Les résultats présentés dans l'article ci-joint suggèrent en

effet un rôle important pour les microdomaines dans l'activation de voies de signalisation du PAFR. En effet, nous avons montré que la protéine Gαq/11, localisée en prédominance dans les radeaux lipidiques et les caveolae, est plus difficilement activable par le PAFR suite à une stimulation au PAF. Ceci a été mis en évidence par la diminution importante de la production d'inositol phosphates chez des cellules de type CHO et HEK 293 suite à un traitement des cellules avec la cyclodextrine. Des résultats similaires ont aussi été obtenus en observant la relâche de calcium intracellulaire chez des kératinocytes humains ainsi que chez des cellules B, c'est-à-dire une baisse importante de la mobilisation calcique suite à l'altération des microdomaines.

Un aspect intéressant de cette étude est celui de l'effet de la cyclodextrine sur l'activation de ERK1/2 induite par une stimulation au PAF. En effet, alors que chez des cellules exprimant la cavéoline-1, connue pour se lier directement à ces MAPK, un traitement à la cyclodextrine diminue la phosphorylation de ERK1/2 induite par le PAF alors que chez des cellules n'exprimant pas de cavéoline-1, c'est l'effet opposé qui est observé, c'est-à-dire que l'altération des radeaux lipidiques de type classique augmente la capacité du PAFR à induire la phosphorylation des MAPK. Ceci suggère donc que la cavéoline-1, de par la liaison spécifique à certaines protéines de signalisation, influence la disponibilité de ces molécules et donc joue un rôle dans la capacité de signalisation du PAFR.

Finalement, un dernier aspect de signalisation, beaucoup plus complexe que les précédents de par le nombre de molécules impliquées a été observé. En effet, le PAF est connu pour induire la production de plusieurs cytokines, dont la chimiokine

interleukine-8, importante pour le recrutement de plusieurs cellules sanguine au site d'inflammation. Ce qui est démontré ici est que l'altération des caveolae, ou des radeaux lipidiques, par la cyclodextrine, diminue en partie la capacité du PAFR à induire la production de cette cytokine. Cela signifierait donc qu'un phénomène physiologique important et aussi complexe que la transcription de molécules inflammatoires induite par le PAF est, du moins en partie, dépendante de l'intégrité des micros domaines lipidiques.

Mis ensembles, ces résultats indiquent clairement que le PAFR est localisé au sein des radeaux lipidiques et en partie au sein des caveolae en présence de cavéoline-1 et la signalisation du récepteur, tout comme la production d'interleukine-8 sont dépendants, en partie, des micros domaines lipidiques. Ces travaux apportent ici une contribution additionnelle en faveur des plate-formes de signalisation prédéfinies que composent les micros domaines lipidiques ainsi que le rôle parfois différentiel des divers sous-types de domaines dans la signalisation cellulaire.

Remerciements

Dr Marek Rola-Pleszczynski, directeur des travaux

Merci de m'avoir appris à gérer un projet de recherche de façon autonome et responsable, d'avoir fourni un soutien constant, de m'avoir transmis une partie de votre connaissance, mais surtout, de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et permis d'y apprendre énormément pendant deux belles années.

Dr Jana Stankova, pour son soutien, ses conseils et la correction de l'article

Dr Christian Le Gouill, pour ses idées, son appui et sa contribution à l'article

Dr Guylain Boulay, pour sa collaboration aux travaux et la correction de l'article

Dr Gilles Dupuis, pour sa contribution majeure à ma compréhension du sujet, ses nombreux conseils et pour avoir accepté de corriger ce mémoire

Dr Gaétan Guillemette, pour la correction de ce mémoire

Simon Rollin et Simon Bousquet, pour leurs efforts et leur contribution à l'article

Patrice Leclerc et Anis Larbis, pour leur aide sur les radeaux lipidiques

Denis Gingras, Steeve Veronneau, Sylvie Turcotte, Maryse Thivierge et Léonid Volkov, pour les techniques apprises en laboratoire

Charles Thomson, Denis Dupré, Inuk Bossé, Josée Lamoureux, Karine Audette,

Rémi Gaudreau, Salim Bounou et Stéphanie McMahon pour leur appui, leurs conseils, le partage de connaissance et surtout, pour avoir fait de ma maîtrise deux années mémorables.

Bibliographie

- Ali, H., R. M. Richardson, et al. (1994). "Regulation of stably transfected platelet activating factor receptor in RBL-2H3 cells. Role of multiple G proteins and receptor phosphorylation." J Biol Chem **269**: 24557-24563.
- Anderson, R. G. (1998). "The caveolae membrane system." Annu Rev Biochem **67**: 199-225.
- Awasthi-Kalia, M., P. P. Schnetkamp, et al. (2001). "Differential effects of filipin and methyl-beta-cyclodextrin on B cell receptor signaling." Biochem Biophys Res Commun **287**: 77-82.
- Benveniste, J., P. M. Henson, et al. (1972). "Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor." J Exp Med **136**: 1356-1377.
- Benveniste, J., M. Tence, et al. (1979). "[Semi-synthesis and proposed structure of platelet-activating factor (P.A.F.): PAF-acether an alkyl ether analog of lysophosphatidylcholine]." C R Seances Acad Sci D **289**: 1037-1040.
- Blank, M. L., F. Snyder, et al. (1979). "Antihypertensive activity of an alkyl ether analog of phosphatidylcholine." Biochem Biophys Res Commun **90**: 1194-1200.
- Bruns, R. R. and G. E. Palade (1968). "Studies on blood capillaries. I. General organization of blood capillaries in muscle." J Cell Biol **37**: 244-276.
- Cao, Y., D. M. Stafforini, et al. (1998). "Expression of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is transcriptionally regulated by mediators of inflammation." J Biol Chem **273**: 4012-4020.

- Chang, W. J., Y. S. Ying, et al. (1994). "Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae." J Cell Biol **126**: 127-138.
- Chao, W. Y., H. J. Tseng, et al. (1993). "[Congenital CSF otitic leakage presenting as rhinorrhea: report of a case]." J Formos Med Assoc **92 Suppl 1**: S44-46.
- Chen, Z., D. J. Dupre, et al. (2002). "Agonist-induced internalization of the platelet-activating factor receptor is dependent on arrestins but independent of G-protein activation. Role of the C terminus and the (D/N)PXXY motif." J Biol Chem **277**: 7356-7362.
- Chen, Z., M. Rola-Pleszczynski, et al. (2003). "Activation of ERK1/2 by platelet-activating factor receptor is independent of receptor internalisation and G-protein activation." Cell Signal **15**: 843-850.
- Couet, J., S. Li, et al. (1997). "Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins." J Biol Chem **272**: 6525-6533.
- Dagenais, P., M. Thivierge, et al. (1997). "Augmented expression of platelet-activating factor receptor gene by TNF-alpha through transcriptional activation in human monocytes." J Leukoc Biol **61**: 106-112.
- Das, K., R. Y. Lewis, et al. (1999). "The membrane-spanning domains of caveolins-1 and -2 mediate the formation of caveolin hetero-oligomers. Implications for the assembly of caveolae membranes in vivo." J Biol Chem **274**: 18721-18728.
- Demopoulos, C. A., R. N. Pinckard, et al. (1979). "Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators)." J Biol Chem **254**: 9355-9358.

- Dennis, E. A. (1997). "The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes." Trends Biochem Sci **22**: 1-2.
- Deo, D. D., T. W. Axelrad, et al. (2002). "Phosphorylation of STAT-3 in response to basic fibroblast growth factor occurs through a mechanism involving platelet-activating factor, JAK-2, and Src in human umbilical vein endothelial cells. Evidence for a dual kinase mechanism." J Biol Chem **277**: 21237-21245.
- Dupre, D. J., C. Le Gouill, et al. (2001). "Inverse agonist activity of selected ligands of platelet-activating factor receptor." J Pharmacol Exp Ther **299**: 358-365.
- Elstad, M. R., D. M. Stafforini, et al. (1989). "Platelet-activating factor acetylhydrolase increases during macrophage differentiation. A novel mechanism that regulates accumulation of platelet-activating factor." J Biol Chem **264**: 8467-8470.
- Engelman, J. A., C. Chu, et al. (1998). "Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain." FEBS Lett **428**: 205-211.
- Engelman, J. A., X. L. Zhang, et al. (1998). "Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers." FEBS Lett **436**: 403-410.
- Engelman, J. A., X. L. Zhang, et al. (1999). "Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines." FEBS Lett **448**: 221-230.

- Ettinger, S. L., R. W. Lauener, et al. (1996). "Protein kinase C delta specifically associates with phosphatidylinositol 3-kinase following cytokine stimulation." J Biol Chem **271**: 14514-14518.
- Ferby, I. M., I. Waga, et al. (1996). "Wortmannin inhibits mitogen-activated protein kinase activation by platelet-activating factor through a mechanism independent of p85/p110-type phosphatidylinositol 3-kinase." J Biol Chem **271**: 11684-11688.
- Fujimoto, T. (1993). "Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae." J Cell Biol **120**: 1147-1157.
- Fujimoto, T., S. Nakade, et al. (1992). "Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae." J Cell Biol **119**: 1507-1513.
- Galbiati, F., B. Razani, et al. (2001). "Emerging themes in lipid rafts and caveolae." Cell **106**: 403-411.
- Glenney, J. R., Jr. and D. Soppet (1992). "Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **89**: 10517-10521.
- Harris, J., D. Werling, et al. (2002). "Caveolae and caveolin in immune cells: distribution and functions." Trends Immunol **23**: 158-164.
- Hattori, M., J. Aoki, et al. (1996). "PAF and PAF acetylhydrolase in the nervous system." J Lipid Mediat Cell Signal **14**: 99-102.
- Ho, Y. S., L. Swenson, et al. (1997). "Brain acetylhydrolase that inactivates platelet-activating factor is a G-protein-like trimer." Nature **385**: 89-93.

- Honda, Z., S. Ishii, et al. (2002). "Platelet-activating factor receptor." J Biochem (Tokyo) **131**: 773-779.
- Honda, Z., M. Nakamura, et al. (1991). "Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung." Nature **349**: 342-346.
- Honda, Z., T. Takano, et al. (1994). "Transfected platelet-activating factor receptor activates mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP kinase kinase in Chinese hamster ovary cells." J Biol Chem **269**: 2307-2315.
- Ihida, K., D. Predescu, et al. (1999). "Platelet activating factor receptor (PAF-R) is found in a large endosomal compartment in human umbilical vein endothelial cells." J Cell Sci **112**: 285-295.
- Ishii, I., E. Saito, et al. (1998). "Agonist-induced sequestration, recycling, and resensitization of platelet-activating factor receptor. Role of cytoplasmic tail phosphorylation in each process." J Biol Chem **273**: 9878-9885.
- Ishii, S., Y. Matsuda, et al. (1996). "A murine platelet-activating factor receptor gene: cloning, chromosomal localization and up-regulation of expression by lipopolysaccharide in peritoneal resident macrophages." Biochem J **314**: 671-678.
- Ishii, S., T. Nagase, et al. (2002). "Platelet-activating factor receptor." Prostaglandins Other Lipid Mediat **68-69**: 599-609.
- Ishii, S. and T. Shimizu (2000). "Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice." Prog Lipid Res **39**: 41-82.
- Izumi, T. and T. Shimizu (1995). "Platelet-activating factor receptor: gene expression and signal transduction." Biochim Biophys Acta **1259**: 317-333.

- Krajewska, W. M. and I. Maslowska (2004). "Caveolins: structure and function in signal transduction." Cell Mol Biol Lett **9**: 195-220.
- Kuruvilla, A., G. Putcha, et al. (1991). "High-level expression of functional platelet-activating factor receptors on a human B lymphoblastoid cell line." Biochem Biophys Res Commun **180**: 1318-1324.
- Kurzchalia, T. V., P. Dupree, et al. (1992). "VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles." J Cell Biol **118**: 1003-1014.
- Le Gouill, C., J. L. Parent, et al. (1997). "Structural and functional requirements for agonist-induced internalization of the human platelet-activating factor receptor." J Biol Chem **272**: 21289-21295.
- Lisanti, M. P., M. Sargiacomo, et al. (1999). "Purification of caveolae-derived membrane microdomains containing lipid-anchored signaling molecules, such as GPI-anchored proteins, H-Ras, Src-family tyrosine kinases, eNOS, and G-protein alpha-, beta-, and gamma-subunits." Methods Mol Biol **116**: 51-60.
- Lisanti, M. P., P. E. Scherer, et al. (1994). "Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis." Trends Cell Biol **4**: 231-235.
- Lisanti, M. P., P. E. Scherer, et al. (1994). "Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease." J Cell Biol **126**: 111-126.
- Lisanti, M. P., Z. Tang, et al. (1995). "Caveolae purification and glycosylphosphatidylinositol-linked protein sorting in polarized epithelia." Methods Enzymol **250**: 655-668.

- Liu, J., P. Oh, et al. (1997). "Organized endothelial cell surface signal transduction in caveolae distinct from glycosylphosphatidylinositol-anchored protein microdomains." J Biol Chem **272**: 7211-7222.
- Lockwich, T. P., X. Liu, et al. (2000). "Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains." J Biol Chem **275**: 11934-11942.
- Lukashova, V., C. Asselin, et al. (2001). "G-protein-independent activation of Tyk2 by the platelet-activating factor receptor." J Biol Chem **276**: 24113-24121.
- Lukashova, V., Z. Chen, et al. (2003). "Janus kinase 2 activation by the platelet-activating factor receptor (PAFR): roles of Tyk2 and PAFR C terminus." J Immunol **171**: 3794-3800.
- Lynch, J. M. and P. M. Henson (1986). "The intracellular retention of newly synthesized platelet-activating factor." J Immunol **137**: 2653-2661.
- Marinissen, M. J. and J. S. Gutkind (2001). "G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms." Trends Pharmacol Sci **22**: 368-376.
- Marques, S. A., L. C. Dy, et al. (2002). "The platelet-activating factor receptor activates the extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and induces proliferation of epidermal cells through an epidermal growth factor-receptor-dependent pathway." J Pharmacol Exp Ther **300**: 1026-1035.
- Maruoka, S., S. Hashimoto, et al. (2000). "PAF-induced RANTES production by human airway smooth muscle cells requires both p38 MAP kinase and Erk." Am J Respir Crit Care Med **161**: 922-929.

- McIntyre, T. M., G. A. Zimmerman, et al. (1986). "Leukotrienes C4 and D4 stimulate human endothelial cells to synthesize platelet-activating factor and bind neutrophils." Proc Natl Acad Sci U S A **83**: 2204-2208.
- McIntyre, T. M., G. A. Zimmerman, et al. (1985). "Cultured endothelial cells synthesize both platelet-activating factor and prostacyclin in response to histamine, bradykinin, and adenosine triphosphate." J Clin Invest **76**: 271-280.
- Miike, S., K. Kurasawa, et al. (2000). "Platelet-activating factor activates mitogen-activated protein kinases through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase and tyrosine kinase in human eosinophils." J Leukoc Biol **67**: 117-126.
- Miyaura, S., N. Maki, et al. (1991). "The hormonal regulation of platelet-activating factor acetylhydrolase activity in plasma." Lipids **26**: 1015-1020.
- Moffett, S., D. A. Brown, et al. (2000). "Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts." J Biol Chem **275**: 2191-2198.
- Montesano, R., J. Roth, et al. (1982). "Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins." Nature **296**: 651-653.
- Morrow, I. C., S. Rea, et al. (2002). "Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation." J Biol Chem **277**: 48834-48841.
- Mutoh, H., S. Ishii, et al. (1994). "Platelet-activating factor (PAF) positively auto-regulates the expression of human PAF receptor transcript 1 (leukocyte-type) through NF-kappa B." Biochem Biophys Res Commun **205**: 1137-1142.

- Nakamura, M., Z. Honda, et al. (1991). "Molecular cloning and expression of platelet-activating factor receptor from human leukocytes." J Biol Chem **266**: 20400-20405.
- Neumann-Giesen, C., B. Falkenbach, et al. (2004). "Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression." Biochem J **378**: 509-518.
- Nguer, C. M., O. Pellegrini, et al. (1992). "Regulation of paf-acether receptor expression in human B cells." J Immunol **149**: 2742-2748.
- Nick, J. A., N. J. Avdi, et al. (1997). "Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP." J Clin Invest **99**: 975-986.
- Norkin, L. C. (2001). "Caveolae in the uptake and targeting of infectious agents and secreted toxins." Adv Drug Deliv Rev **49**: 301-315.
- Oh, P. and J. E. Schnitzer (2001). "Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G(q) binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default." Mol Biol Cell **12**: 685-698.
- Parent, J. L., C. Le Gouill, et al. (1996). "Mutations of two adjacent amino acids generate inactive and constitutively active forms of the human platelet-activating factor receptor." J Biol Chem **271**: 7949-7955.
- Parolini, I., M. Sargiacomo, et al. (1999). "Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the golgi complex." J Biol Chem **274**: 25718-25725.

- Patel, S., S. K. Joseph, et al. (1999). "Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors." Cell Calcium **25**: 247-264.
- Pei, Y., L. A. Barber, et al. (1998). "Activation of the epidermal platelet-activating factor receptor results in cytokine and cyclooxygenase-2 biosynthesis." J Immunol **161**: 1954-1961.
- Peplow, P. V. (1999). "Regulation of platelet-activating factor (PAF) activity in human diseases by phospholipase A2 inhibitors, PAF acetylhydrolases, PAF receptor antagonists and free radical scavengers." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **61**: 65-82.
- Prescott, S. M., G. A. Zimmerman, et al. (1990). "Platelet-activating factor." J Biol Chem **265**(29): 17381-4.
- Prescott, S. M., G. A. Zimmerman, et al. (2000). "Platelet-activating factor and related lipid mediators." Annu Rev Biochem **69**: 419-445.
- Pritchard, P. H. (1987). "The degradation of platelet-activating factor by high-density lipoprotein in rat plasma. Effect of ethynyloestradiol administration." Biochem J **246**: 791-794.
- Razani, B., C. S. Rubin, et al. (1999). "Regulation of cAMP-mediated signal transduction via interaction of caveolins with the catalytic subunit of protein kinase A." J Biol Chem **274**: 26353-26360.
- Resh, M. D. (2004). "Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins." Subcell Biochem **37**: 217-232.

- Richardson, R. M., B. Haribabu, et al. (1996). "Cross-desensitization among receptors for platelet activating factor and peptide chemoattractants. Evidence for independent regulatory pathways." J Biol Chem **271**: 28717-28724.
- Rothberg, K. G., J. E. Heuser, et al. (1992). "Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats." Cell **68**: 673-682.
- Sargiacomo, M., P. E. Scherer, et al. (1995). "Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization." Proc Natl Acad Sci U S A **92**: 9407-9411.
- Scherer, P. E., R. Y. Lewis, et al. (1997). "Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo." J Biol Chem **272**: 29337-29346.
- Scherer, P. E., T. Okamoto, et al. (1996). "Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family." Proc Natl Acad Sci U S A **93**: 131-135.
- Scherer, P. E., Z. Tang, et al. (1995). "Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe." J Biol Chem **270**: 16395-16401.
- Schlegel, A. and M. P. Lisanti (2000). "A molecular dissection of caveolin-1 membrane attachment and oligomerization. Two separate regions of the caveolin-1 C-terminal domain mediate membrane binding and oligomer/oligomer interactions in vivo." J Biol Chem **275**: 21605-21617.

- Shimada, A., Y. Ota, et al. (1998). "In situ expression of platelet-activating factor (PAF)-receptor gene in rat skin and effects of PAF on proliferation and differentiation of cultured human keratinocytes." J Invest Dermatol **110**: 889-893.
- Shukla, S. D. (1991). "Inositol phospholipid turnover in PAF transmembrane signalling." Lipids **26**: 1028-1033.
- Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Science **175**: 720-731.
- Sisson, J. H., S. M. Prescott, et al. (1987). "Production of platelet-activating factor by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. Correlation of synthesis with release, functional events, and leukotriene B4 metabolism." J Immunol **138**: 3918-3926.
- Smart, E. J., Y. S. Ying, et al. (1995). "A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells." Proc Natl Acad Sci U S A **92**: 10104-10108.
- Snyder, F. (1995). "Platelet-activating factor: the biosynthetic and catabolic enzymes." Biochem J **305**: 689-705.
- Stafforini, D. M., M. R. Elstad, et al. (1990). "Human macrophages secrete platelet-activating factor acetylhydrolase." J Biol Chem **265**: 9682-9687.
- Stafforini, D. M., T. M. McIntyre, et al. (1987). "Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor." J Biol Chem **262**: 4215-4222.
- Stahlhut, M. and B. van Deurs (2000). "Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton." Mol Biol Cell **11**: 325-337.

- Tachado, S. D., P. Gerold, et al. (1996). "Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway." J Immunol **156**: 1897-1907.
- Tachado, S. D., P. Gerold, et al. (1997). "Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium, Trypanosoma, and Leishmania: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties." Proc Natl Acad Sci U S A **94**: 4022-4027.
- Takano, T., Z. Honda, et al. (1994). "Role of cytoplasmic tail phosphorylation sites of platelet-activating factor receptor in agonist-induced desensitization." J Biol Chem **269**: 22453-22458.
- Tang, Z., P. E. Scherer, et al. (1996). "Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle." J Biol Chem **271**: 2255-22561.
- Tarbet, E. B., D. M. Stafforini, et al. (1991). "Liver cells secrete the plasma form of platelet-activating factor acetylhydrolase." J Biol Chem **266**: 16667-16673.
- Thivierge, M., J. L. Parent, et al. (1996). "Modulation of human platelet-activating factor receptor gene expression by protein kinase C activation." J Immunol **157**: 4681-4687.
- Thomsen, P., K. Roepstorff, et al. (2002). "Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking." Mol Biol Cell **13**: 238-250.

- Travers, J. B., Q. Li, et al. (1989). "Identification of functional platelet-activating factor receptors in Raji lymphoblasts." J Immunol **143**: 3708-3713.
- Vallejo, J. and C. D. Hardin (2005). "Expression of caveolin-1 in lymphocytes induces caveolae formation and recruitment of phosphofructokinase to the plasma membrane." Faseb J **19**: 586-597.
- van Biesen, T., B. E. Hawes, et al. (1996). "G(o)-protein alpha-subunits activate mitogen-activated protein kinase via a novel protein kinase C-dependent mechanism." J Biol Chem **271**: 1266-1279.
- van den Berg, C. W., T. Cinek, et al. (1995). "Exogenous glycosyl phosphatidylinositol-anchored CD59 associates with kinases in membrane clusters on U937 cells and becomes Ca(2+)-signaling competent." J Cell Biol **131**: 669-677.
- Venema, V. J., H. Ju, et al. (1997). "Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain." J Biol Chem **272**: 28187-218190.
- Wang, H., X. Tan, et al. (1997). "Regulation of platelet-activating factor receptor gene expression in vivo by endotoxin, platelet-activating factor and endogenous tumour necrosis factor." Biochem J **322**: 603-608.
- Way, M. and R. G. Parton (1995). "M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein." FEBS Lett **376**: 108-112.
- Williams, T. M. and M. P. Lisanti (2004). "The caveolin proteins." Genome Biol **5**: 214.
- Woodman, S. E., A. Schlegel, et al. (2002). "Mutational analysis identifies a short atypical membrane attachment sequence (KYWFYR) within caveolin-1." Biochemistry **41**: 3790-3795.

Wu, C., S. Butz, et al. (1997). "Tyrosine kinase receptors concentrated in caveolae-like domains from neuronal plasma membrane." J Biol Chem **272**: 3554-3559.